

**PENGARUH EKSTRAK *ALLIUM SATIVUM* TERHADAP  
DAYA TAHAN MENCIT Balb/C YANG DIINFEKSI  
*LISTERIA MONOCYTOGENES***

**The effects of garlic extract on the immunity of  
Balb/C Mice against *Listeria monocytogenes***



**TESIS**

**untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat Sarjana S-2**

**Magister Ilmu Biomedik**

**ENDANG SAWITRI  
G4A001002**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
Desember  
2003**

## TESIS

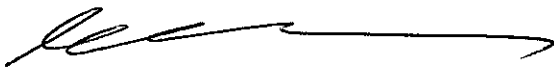
### **PENGARUH EKSTRAK *ALLIUM SATIVUM* TERHADAP DAYA TAHAN MENCIT Balb/C YANG DIINFEKSI *LISTERIA MONOCYTOGENES***

disusun oleh

**Endang Sawitri**  
G4A001002

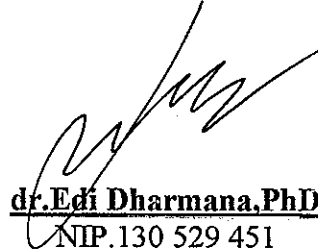
telah dipertahankan di depan Tim Penguji Tesis  
pada tanggal 18 Desember 2003 dan dinyatakan  
telah memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing Utama



**Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, SpPA(K), FIAC**  
NIP. 130 368 076


Pembimbing Anggota

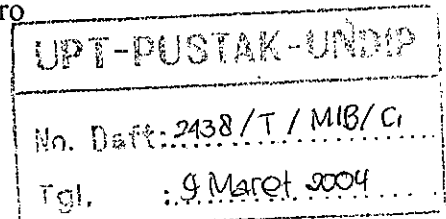


**dr. Edi Dharmana, PhD**  
NIP. 130 529 451



Mengetahui :  
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Pascasarjana Universitas Diponegoro

  
**Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)**  
NIP. 130 352 549



## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Semarang, 18 Desember 2003

Endang Sawitri

## **RIWAYAT HIDUP**

Nama : dr.Endang Sawitri  
Tempat/tanggal lahir : Manado, 05 Mei 1968  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Status : Menikah  
Pekerjaan : Staf Pengajar PPD UNMUL Samarinda  
Alamat Kantor : Jl.Kerayan,Kampus Gunung Kelua Samarinda 75119  
telp. (0541)748581, faks (0541) 748449  
Gol/Pangkat/NIP : III B / Penata Muda Tk I / 132 299 495

## **RIWAYAT PENDIDIKAN**

1.SD RK XIII Manado	1976 – 1981
2.SMP Negeri I Manado	1981 – 1984
3.SMA Negeri I Manado	1984 – 1987
4.FK UNSRAT Manado, dokter	1987 – 1994
5.Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP	2001 – 2003

## **RIWAYAT PEKERJAAN**

1.Dokter PTT di Puskesmas Tanawangko Kabupaten Minahasa Sulut 1995-1998  
2.Staf Pengajar PPD UNMUL Samarinda 2001 - sekarang

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT., karena hanya dengan berkah, rahmat dan anugerahNya sehingga tesis dengan judul “Pengaruh Ekstrak *Allium sativum* Terhadap Daya Tahan Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Listeria monocytogenes*” ini dapat selesai tepat pada waktunya.

Pada kesempatan ini pula penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Gubernur Provinsi Kalimantan Timur dan Rektor Universitas Mulawarman yang telah memberikan bantuan dana beasiswa guna kelancaran studi.
2. Pimpinan dan Staf Pengajar PPD UNMUL yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan pascasarjana dan senantiasa memberi semangat untuk maju.
3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang memberi peluang bagi penulis untuk meningkatkan ilmu pengetahuan dan menerima dana BPPS.
4. Prof.dr.H.Soebowo,SpPA(K) sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana UNDIP beserta seluruh staf yang telah mengajarkan keilmuannya.
5. Prof.Dr.dr.H.Tjahjono,SpPA(K),FIAC sebagai Pembimbing Utama dan dr.Edi Dharmana,PhD sebagai Pembimbing Anggota yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya serta memberi pengarahan sekaligus dorongan untuk terus maju.

6. Tim Penguji Tesis (Pembimbing Utama, Pembimbing Anggota, dr.Parno Widjojo,SpFK, drg.Henry Setyawan,M.Sc dan dr.Neni Susilaningsih,M.Si yang juga sebagai konsultan laboratorium).
7. dr.Winarto,DMM,SpM,Sp.MK dan dr.Kis Djamiatun,M.Sc sebagai narasumber yang telah memberikan petunjuk, saran dan pengarahan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis guna mencapai hasil yang baik.
8. Pimpinan dan staf Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP, Ketua Bagian Biokimia FK UNDIP beserta staf laboratorium dan Kepala Laboratorium Kesehatan Semarang bersama staf unit Bakteriologi yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan teknis laboratoris sekaligus memberikan kesempatan kepada penulis untuk memanfaatkan fasilitas laboratorium untuk penelitian tesis.
9. Suami tercinta yang senantiasa memberikan doa restu dan semangat serta kerelaannya mendampingi penulis selama menempuh pendidikan.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberi dukungan dan bantuan selama pendidikan hingga selesainya penulisan tesis ini.

Akhir kata dengan penuh kerendahan hati penulis mohon maaf bila terdapat kata-kata yang kurang berkenan dalam penulisan tesis ini dan semoga Allah SWT., senantiasa melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada semua pihak terkait. Insya Allah tesis ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan serta bagi mereka yang membutuhkannya.

Semarang, 18 Desember 2003

Penulis.

## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	i
Halaman Persetujuan .....	ii
Halaman Pernyataan .....	iii
Riwayat Hidup .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	viii
Daftar Gambar .....	x
Daftar Singkatan .....	xi
Daftar Lampiran .....	xii
Abstrak .....	xiii
Abstract .....	xiv
 BAB 1. PENDAHULUAN .....	 1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	5
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	 6
2.1. Sistem Imun Tubuh .....	6
2.1.1. Respons Imun .....	6
2.1.2. Sel Makrofag .....	13
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
2.2.1. Aspek Bakteriologi .....	20
2.2.2. Faktor Virulensi .....	22
2.2.3. Multiplikasi di Dalam Hepar .....	24
2.2.4. Respons Imun terhadap <i>L.monocytogenes</i> .....	26
2.3. <i>Allium sativum</i> .....	32
2.3.1. Sinonim dan Taksonomi .....	32
2.3.2. Morfologi Tumbuhan .....	32
2.3.3. Habitat .....	33
2.3.4. Kandungan Kimia .....	34
2.3.5. Preparat Ekstrak .....	36
2.3.6. Farmakokinetik / Bioavailabilitas .....	37
2.3.7. Efek Farmakologi .....	48
2.3.8. Efek terhadap Imunitas Tubuh .....	41

BAB 3. KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....	43
3.1. Kerangka Teori .....	43
3.2. Kerangka Konsep.....	44
3.3. Hipotesis .....	45
3.4. Keterbatasan Penelitian.....	45
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	46
4.1. Rancangan Penelitian.....	46
4.2. Populasi dan Sampel.....	48
4.3. Variabel Penelitian.....	51
4.4. Bahan dan Reagen Penelitian.....	52
4.5. Alat / Instrumen Penelitian .....	53
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	54
4.7. Prosedur Pengumpulan Data.....	54
4.8. Alur Kerja Penelitian .....	57
4.9. Prosedur Pemeriksaan.....	58
4.10. Analisa Data.....	61
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	63
5.1. Hasil Penelitian .....	63
5.1.1. Kemampuan Fagositosis Makrofag .....	63
5.1.2. Hitung Kuman Kultur Organ Hepar .....	66
5.1.3. Ketahanan Hidup ( <i>survival</i> ).....	69
5.2. Pembahasan.....	72
5.2.1. Kemampuan Fagositosis Makrofag .....	72
5.2.2. Hitung Kuman Kultur Organ Hepar .....	75
5.2.3. Ketahanan Hidup ( <i>survival</i> ).....	76
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....	78
6.1. Kesimpulan .....	78
6.2. Saran .....	79
BAB 7. RINGKASAN.....	80
DAFTAR PUSTAKA .....	84
LAMPIRAN.....	93



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Spesies dalam genus <i>Listeria</i> dan sifat bakteriologisnya.....	21
Tabel 2. Hasil penelitian kemampuan fagositosis makrofag (indeks fagositik).....	63
Tabel 3. Hasil analisis indeks fagositik makrofag.....	63
Tabel 4. Hasil uji <i>Mann-Whitney U</i> indeks fagositik makrofag.....	65
Tabel 5. Hasil penelitian hitung kuman kultur organ hepar.....	66
Tabel 6. Hasil analisis hitung kuman kultur organ hepar (CFU/gram).....	66
Tabel 7. Hasil uji <i>Mann-Whitney U</i> hitung kuman kultur organ hepar.....	68
Tabel 8. Hasil penelitian prosentase <i>survival</i> .....	70
Tabel 9. Prosentase kumulatif <i>survival</i> .....	71
Tabel 10. Hasil uji <i>Logrank survival</i> .....	71

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Presentasi antigen yang berasosiasi dengan MHC II.....	11
Gambar 2. Tiga proses aktivasi sel Th.....	13
Gambar 3. Skema patofisiologi infeksi <i>L.monocytogenes</i> .....	22
Gambar 4. Respons imun terhadap infeksi <i>L.monocytogenes</i> .....	27
Gambar 5. Transformasi dan struktur kimia unsur pokok aktif <i>A.sativum</i> .....	35
Gambar 6. Grafik <i>boxplot</i> indeks fagositik makrofag .....	64
Gambar 7. Grafik <i>boxplot</i> hitung kuman kultur organ hepar.....	67
Gambar 8. Perbandingan kurva <i>survival</i> .....	71

## DAFTAR SINGKATAN

1. AGE	= Aged Garlic Extract
2. APC	= Antigen Presenting Cell
3. BCG	= Bacillus Calmette-Guarin
4. CFR	= Case Fatality Rate
5. CFU	= Colony Forming Unit
6. CTL	= Cytotoxic T Lymphocyte
7. DAS	= Diallyl Sulfide
8. DADS	= Diallyl Disulfide
9. DGF	= Dehidrated Garlic Powder
10. FGF	= Fibroblast Growth Factor
11. GM-CSF	= Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
12. HIB	= Human Infusion Broth
13. HIV	= Human Immunodeficiency Virus
14. HGJ	= Heated Garlic Juice
15. HMG-CoA	= Hepatic Hydroxy Metthyglutaril-CoA
16. HLA	= Human Leucocyte Antigen
17. IBD	= Inflammatory Bowel Desease
18. IFN- $\gamma$	= Interferon- $\gamma$
19. iNOS	= Inducible Nitric Oxyde Synthase
20. MAF	= Macrophage Activating Factor
21. MHC	= Major Histocompatibility Complex
22. MIF	= Migration Inhibition Factor
23. MN	= Mononuklear
24. NK	= Natural Killer
25. NO	= Nitric Oxyde
26. PMN	= Polimorfonuklear
27. ROI	= Reactive Oxygen Intermediates
28. ROS	= Reactive Oxygen Species
29. SD	= Standart Deviasi
30. Th	= T helper
31. TNF	= Tumor Necrosis Factor

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto fagositosis makrofag .....	93
a. Kelompok Kontrol (K) .....	93
b. Kelompok P1 (ekstrak <i>A.sativum</i> 1 mg/hari) .....	93
c. Kelompok P2 (ekstrak <i>A.sativum</i> 2 mg/hari) .....	94
d. Kelompok P3 (ekstrak <i>A.sativum</i> 4 mg/hari) .....	94
Lampiran 2. Foto koloni kuman <i>L.monocytogenes</i> yang dikultur pada media	
Agar Darah .....	95
a. Kelompok Kontrol (K) .....	95
b. Kelompok Perlakuan (dengan ekstrak <i>A.sativum</i> ) .....	95
Lampiran 3. Alat hitung kuman ( <i>coloni counter</i> ) .....	96
Lampiran 4. Hasil analisis statistik .....	97

## **PENGARUH EKSTRAK *ALLIUM SATIVUM* TERHADAP DAYA TAHAN MENCIT Balb/C YANG DIINFEKSI *LISTERIA MONOCYTOGENES***

**Endang Sawitri.**

### **ABSTRAK**

**Latar belakang :** *Allium sativum* (bawang putih) merupakan tanaman tradisional yang mudah tumbuh dimana saja. Manfaatnya dalam mengobati berbagai penyakit yang ringan juga sudah banyak diketahui masyarakat. Tetapi perannya sebagai imunomodulator atau imunostimulan yang sangat penting untuk mengatasi infeksi bakteri intraseluler belum banyak dikenal.

**Tujuan :** Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak *Allium sativum* terhadap daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *Listeria monocytogenes*.

**Metoda :** Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test only control group* menggunakan mencit Balb/C betina sehat, berumur 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM Yogyakarta. Sebanyak 72 ekor mencit diadaptasikan 1 minggu lalu dibagi secara acak menjadi 24 ekor untuk pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah koloni kuman (kelompok I) dan 48 ekor untuk pengamatan ketahanan hidup (kelompok II). Mereka diberi pakan dan minum *ad libitum* selama penelitian. Kelompok I dibagi lagi secara acak menjadi 4 kelompok ; K=kelompok kontrol tanpa perlakuan ; P1=diberi ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari peroral selama 14 hari ; P2=diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari peroral selama 14 hari ; P3=diberi ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari peroral selama 14 hari. Semuanya diinfeksi dengan *L.monocytogenes*  $2,5 \times 10^6$  secara intravena pada hari ke-9 dan dibunuh pada hari ke-14 untuk diperiksa. Untuk pengamatan *survival*, kelompok II dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dan diberi perlakuan ekstrak *A.sativum* yang sama dengan kelompok I. Selanjutnya pada hari ke-15 diinfeksi dengan *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  secara intravena lalu dilakukan pengamatan mulai hari pertama sampai hari ke-21 pasca infeksi. Kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah koloni kuman kultur organ hepar dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann-Whitney U*, *survival* ditentukan dengan grafik *survival rate* dan dianalisis dengan *logrank test*.

**Hasil :** Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi (1 mg/hari, 2 mg/hari dan 4 mg/hari) dapat meningkatkan indeks fagositik makrofag secara bermakna ( $p=0,002$ ) dimana kemampuan tertinggi terdapat pada kelompok P3. Hitung kuman kultur organ hepar juga menurun secara bermakna pada kelompok P2 (2 mg/hari) dengan  $p=0,004$  dan P3 (4 mg/hari) dengan  $p=0,002$ . *Survival* pada ketiga kelompok perlakuan juga meningkat tetapi peningkatan yang signifikan terjadi pada kelompok P2 ( $p=0,0125$ ) dan P3 ( $p=0,0208$ ).

**Kesimpulan :** Pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi dapat meningkatkan daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* dinilai dari indeks fagositik, hitung kuman kultur organ hepar dan *survival*nya.

**Kata kunci :** *A.sativum*, *L.monocytogenes*, mencit Balb/C, indeks fagositik, hitung kuman, *survival*.

**THE EFFECTS OF GARLIC EXTRACT ON THE IMMUNITY OF  
Balb/C MICE AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
Endang Sawitri**

**ABSTRACT**

**Study background :** Garlic (*Allium sativum*) is a traditional herbal medicine commonly used for the treatment of mild infection in many countries. Despite its immunostimulatory properties to combat intracellular bacterial infection, the efficacy of garlic for the treatment of *L.monocytogenes* infection has not been studied.

**Objectives :** The aim of this study was to evaluate the effects of garlic extract on the immunity against *L.monocytogenes* infection.

**Methods :** The design of this laboratory experimental study was the post test only control group using 8-10 weeks of age female Balb/C mice. Seventy-two mice were divided into 2 groups ( group I and II). The first group (24 mice) was then divided further into 4 subgroup (K=control, P1, P2 and P3). Garlic extract with the dose of 1mg, 2mg and 4mg per day were administered orally to P1, P2 and P3 sub groups respectively for 14 days. On the 9<sup>th</sup> day, all mice of each subgroup were intravenously injected with  $2.5 \times 10^6$  CFU of *L.monocytogenes* and sacrificed on the day 14<sup>th</sup> for the measurement of phagocytic activity of macrophage and bacterial growth in the liver. The second group (group II) were divided into 4 subgroup (K, P1, 2 and 3) 12 mice each, for the survival study. For this study,  $5 \times 10^6$  CFU of *L.monocytogenes* was used and the dose variation of garlic extract was exactly similar to group I.

**Results :** it is demonstrated in this study that all dose variations of garlic extract could significantly increase the phagocytic activity of macrophage (phagocytic index) ( $p=0.002$ ). Significant decrease of bacterial count in the liver are found in P2 (2mg/day of garlic) ( $p=0.004$ ) and P3 (4mg/day of garlic) ( $p=0.002$ ). Survival of the mice are significantly increased in P2 ( $p=0.0125$ ) and P3 ( $p=0.0208$ ) subgroup.

**Conclusion :** Garlic extract with the dose of 1, 2 and 4 mg per day could significantly increase the immunity of Balb/C mice against *L. monocytogenes*.

**Key words :** Garlic, *Listeria monocytogenes*, Balb/C mice, phagocytic index, bacterial count, survival.

# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1. LATAR BELAKANG

Di negara maju seperti Eropa, khususnya Jerman dan Belanda melalui penelitian ilmiah telah banyak diketahui dan dibuktikan banyak tanaman obat mempunyai aktivitas stimulasi non-spesifik terhadap sistem imun, bersifat sebagai imunomodulator dan bahkan telah ada yang dipakai sebagai bahan fitoterapi. Sedangkan di Indonesia dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan tanaman obat, masih jarang dilaporkan adanya pengembangan dan penelitian imunomodulator bahan tanaman bahkan sampai saat ini belum dikenal adanya suatu pedoman secara khusus untuk mempelajari pemakaian tanaman obat yang dikaitkan dengan sistem imun<sup>1</sup>. Imunomodulator tidak menyebabkan terjadinya respons imun seluler maupun humoral atau bukan merupakan suatu antigen, melainkan menyebabkan modulasi dari respons imun berupa stimulasi atau supresi. Dengan demikian imunomodulator mempunyai aspek terapi khusus yang berkaitan dengan mekanisme sistem imun sehingga dapat digunakan untuk terapi terhadap penyakit-penyakit yang berkaitan dengan sistem imun seperti penyakit infeksi, keganasan dan gangguan fungsi sistem imun<sup>2,3</sup>.

Tanaman *Allium sativum* L di Indonesia dikenal dengan nama bawang putih merupakan salah satu tanaman tradisional yang telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional untuk berbagai jenis penyakit<sup>4,5,6</sup>. Berbagai hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak *A.sativum* mempunyai aktivitas sebagai anti bakteri,

anti virus, anti parasitik anti jamur dan anti tumor dengan cara meningkatkan fungsi sistem imun<sup>4,7</sup>. Studi *in vitro* pada makrofag tikus yang diberi paparan *pokeweed mitogen* memperlihatkan bahwa ekstrak *A.sativum* dapat meningkatkan *oxidative burst* dan meningkatkan blastogenesis limfosit T secara signifikan<sup>7</sup>. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak kering *A.sativum* paling efektif untuk memperkuat fungsi imun dibanding bentuk preparat lain<sup>8</sup>. Di Indonesia meskipun tanaman ini sudah bukan barang asing lagi, namun aplikasi untuk suatu penyakit tertentu terutama sebagai imunomodulator (imunostimulan) dalam melawan bakteri intraseluler yang didukung data ilmiah mungkin belum pernah dilaporkan.

Dalam penelitian eksperimental laboratorik, induksi infeksi dengan organisme *Listeria monocytogenes* banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler<sup>9,10</sup>. Derajat dan angka progresi penyakit listeriosis yang disebabkan bakteri ini selain ditentukan oleh jumlah bakteri yang tertelan dengan makanan, juga ditentukan oleh tingkat virulensi strain *L.monocytogenes* dan imunitas dari pejamu<sup>11,12</sup>. Sebagai bakteri intraseluler fakultatif, *L.monocytogenes* mampu bertahan hidup dan mengadakan replikasi di dalam makrofag sekaligus menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Mikroba ini tidak dapat dijangkau oleh antibodi sirkulasi, oleh sebab itu untuk eliminasi dibutuhkan mekanisme imun yang sangat berbeda dari mekanisme pertahanan melawan bakteri ekstrasel. Respons imun protektif utama melawan patogen ini adalah imunitas seluler<sup>9,11</sup>. Imunitas seluler terdiri atas dua tipe reaksi *killing* terhadap mikroba berupa hasil aktivasi makrofag oleh sitokin berasal dari sel T dan lisis sel terinfeksi oleh sel T CD8<sup>+</sup>. Respons imun non-spesifik paling awal



melawan *L.monocytogenes* terutama diperantarai oleh fagosit profesional (makrofag) tanpa peran sel limfosit. Reaksi selanjutnya tergantung pada kemampuan pejamu untuk meningkatkan respons imun seluler spesifik terutama sel T CD4<sup>+</sup> subset Th1 yang memproduksi IFN- $\gamma$  untuk mengaktivasi makrofag sehingga memperkuat mekanisme bakterisidalnya<sup>9,13,14</sup>.

Apabila respons imun seluler pejamu tidak edekuat, *L.monocytogenes* akan bermultiplikasi secara bebas di dalam makrofag dan sel lain. Sel hepatosit merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan organisme ini. Agar dapat dihancurkan oleh makrofag yang teraktivasi kuman ini perlu dikeluarkan dahulu dari sel hepatosit. Pengeluaran dari hepatosit dilakukan dengan penghancuran sel-sel ini oleh leukosit yang berkumpul di sekitar tempat terinfeksi. Penelitian histopatologi hepar oleh Conlan et al. menunjukkan adanya sebaran netrofil dan sel-sel hepatosit terinfeksi yang hancur setelah 48 jam inokulasi *L.monocytogenes*. Selain netrofil, sel NK dan sel T juga ikut berperan dan ternyata juga ditemukan makrofag di sekitar tempat infeksi. Kemampuan bakteri ini untuk bermultiplikasi di dalam hepatosit dapat diperiksa dari hasil kultur kuman pada organ hepar<sup>15,16</sup>.

Listeriosis yang disebabkan oleh *L.monocytogenes* mempunyai *case fatality rate* (proporsi episode penyakit yang berakhir dengan kematian) yang tertinggi dari seluruh penyakit yang tersebar lewat makanan (20 % - 40 %)<sup>17,18</sup>. Untuk penyakit yang sering mematikan seperti ini, keluaran dapat ditunjukkan sebagai kasus kematian atau angka ketahanan hidup (*survival rate*)<sup>19</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak *A.sativum* terhadap daya tahan mencit yang terinfeksi *L.monocytogenes* dengan menilai kemampuan fagositosis makrofag, jumlah koloni kuman pada kultur organ hepar dan ketahanan hidup (*survival*) karena hal ini belum pernah dilaporkan. Penelitian dilakukan pada mencit Balb/C dimana patogenesisnya mirip dengan listeriosis pada tubuh manusia sehingga hasil penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan pada manusia.

## **1.2. PERUMUSAN MASALAH**

Bagaimana pengaruh ekstrak *A.sativum* terhadap daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* bila dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut ?

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya perbedaan daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* bila diberi ekstrak *A.sativum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1. Membuktikan adanya peningkatan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

2. Membuktikan adanya pengurangan jumlah koloni kuman pada kultur organ hepar kelompok mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.
3. Membuktikan adanya peningkatan ketahanan hidup pada kelompok mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut.

#### **1.4. MANFAAT PENELITIAN**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan rujukan untuk mengetahui peranan *A.sativum* sebagai salah satu tanaman tradisional yang dapat meningkatkan imunitas tubuh dalam melawan patogen intraseluler, sehingga dapat dipertimbangkan sebagai suplemen atau terapi tambahan pada penyakit infeksi oleh bakteri intraseluler. Karena penelitian ini bersifat eksperimental pada hewan coba, diharapkan hasilnya dapat memberikan informasi dan landasan bagi penelitian selanjutnya.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. SISTEM IMUN TUBUH**

Manusia hidup dalam lingkungan sekitarnya yang dipenuhi oleh berbagai mikroorganisme dan parasit, baik itu patogen atau tidak. Dimanapun kita berada, tubuh akan selalu berhubungan dengan virus, bakteri, protozoa, jamur dan berbagai jenis parasit lainnya. Tubuh manusia mengembangkan mekanisme yang cukup canggih untuk menghadapi patogen yang memiliki potensi menyerbu ke dalam tubuh<sup>20</sup>. Sel-sel dan molekul yang bertanggung jawab dalam mekanisme pertahanan tubuh merupakan sistem imun, sedangkan respons imun adalah reaksi tubuh yang normal sebagai tanggapan apabila terpapar oleh substansi asing atau antigen<sup>21,22</sup>.

##### **2.1.1. Respons Imun**

Dalam pandangan sekarang, respons imun diperlukan untuk tiga hal, yaitu pertahanan, homeostasis dan pengawasan. Pertahanan ditujukan terhadap infeksi mikroorganisme, homeostasis untuk eliminasi komponen-komponen tubuh yang sudah tua dan pengawasan dibutuhkan untuk menghancurkan sel-sel yang mengalami mutasi terutama yang mengarah ke keganasan. Dengan kata lain, respons imun dapat diartikan sebagai suatu reaksi agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan di luar dan di dalam tubuh<sup>21,23</sup>.

#### 2.1.1.1. Jenis Respons Imun

Bila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, maka ada dua jenis respons imun yang mungkin terjadi, yaitu :

##### a. Respons imun non spesifik.

Respons imun non spesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) yang memberikan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai organisme, oleh karena dapat memberikan respons langsung terhadap antigen walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut.

Komponen-komponen utama sistem imun non spesifik berupa 1). barier berwujud fisik/mekanik dan biokimia<sup>23,24,25</sup>, 2). perangkat humoral, antara lain berupa : komplemen; protein kompleks yang banyak dijumpai di dalam serum individu normal, berperan meningkatkan fagositosis dan mampu merusak membran bakteri apabila telah terpacu menjadi aktif melalui reaksi enzimatik, *interferon* (IFN); suatu glikoprotein yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh berinti dan terdiri dari IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  dan IFN- $\gamma$ , dimana ketiganya dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik sel NK (*natural killer*) dengan berbagai cara. Fungsi yang lain diantaranya menghambat replikasi virus<sup>22,23,24</sup>, 3). perangkat seluler, yang mempunyai fungsi utama fagositosis. Ini diperankan oleh sel fagositik seperti monosit, makrofag dan netrofil. Fagosit ini merupakan komponen utama dalam imunitas alamiah terhadap bakteri pada umumnya<sup>20,22,24</sup>.

### **b. Respons imun spesifik**

Respons imun spesifik merupakan respons didapat (*acquired immunity/ adaptif*), yang timbul terhadap antigen tertentu, terhadap mana tubuh pernah terpapar sebelumnya. Jadi sistem imun ini membutuhkan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum dapat memberikan responsnya sehingga dikatakan berperan di garis belakang (*the second line of defense*)<sup>24,26,27</sup>. Ciri utama sistem imun spesifik adalah spesifisitas, diversitas, memori, spesialisasi, membatasi diri (*self limitation*) dan membedakan *self* dari *non-self*<sup>24,27</sup>.

Mekanisme fungsional sistem pertahanan adaptif ini dapat melalui<sup>21,22,27</sup> :

- Aktivitas komponen sel yang bertanggung jawab dalam imunitas seluler. Yang berfungsi disini adalah limfosit T, terutama untuk melawan mikroorganisme intraseluler.
- Aktivitas zat terlarut sebagai produk sel yang bertanggung jawab dalam imunitas humoral. Respons imun ini dilaksanakan oleh sel B dan produknya, yaitu antibodi dan berfungsi dalam pertahanan terhadap mikroba ekstraseluler.

Sebenarnya pengelompokan respons imun ke dalam dua jenis respons di atas terlalu disederhanakan karena ternyata kedua jenis respons imun tersebut saling meningkatkan efektivitas dan respons imun yang terjadi merupakan interaksi antara satu komponen dengan komponen lain yang terdapat di dalam sistem imun<sup>26</sup>.

### 2.1.1.2. Fase Respons Imun Spesifik

Tahap-tahap terjadinya respons imun spesifik dibagi dalam tiga fase, yaitu fase pengenalan (*recognition phase*), fase aktivasi (*activation phase*) dan fase efektor.

#### a. Fase Pengenalan

Sistem pengenalan antigen oleh sel T tidak lepas dari bantuan molekul spesifik yang merupakan produk gen polimorfik MHC (*Major Histocompatibility Complex*) pada mencit atau HLA (*Human Leucocyte Antigen*) pada manusia. Pada dasarnya semua sel berinti di dalam tubuh menghasilkan produk MHC/HLA kelas I, sementara sel khusus lainnya menghasilkan produk MHC/HLA kelas II. Yang disebut sel khusus disini ialah kelompok sel yang bertugas membantu sel T mengenali antigen dalam kaitannya dengan molekul MHC/HLA kelas II (*MHC restriction*), yaitu dengan cara memproses dan kemudian menyajikan antigen yang telah diproses tadi kepada sel T. Kelompok sel ini dikenal sebagai sel penyaji antigen (*antigen presenting cells, APC*), misalnya makrofag, sel B, sel dendritik dan mungkin pada manusia ada sel endotel<sup>21,22</sup>.

#### Presentasi antigen yang berasosiasi dengan MHC II.

Sel T  $CD4^+$  yang merupakan populasi sel T-helper (Th) mengenal peptida yang berasosiasi dengan MHC kelas II pada permukaan APC. Peptida tersebut umumnya berasal dari antigen protein terlarut atau mikroba ekstraseluler. Makrofag yang salah satu fungsinya sebagai APC yang mengekspresikan MHC II akan memasukkan protein asing dengan cara endositosis

(internalisasi) ke endosom. Ini menyebabkan terjadi degradasi protein (antigen) oleh enzim proteolitik sehingga terbentuk fragmen-fragmen peptida asing tersebut. MHC II yang disintesis di retikulum endoplasma dan terikat pada vesikel eksositik akan berikatan dengan fragmen peptida asing tersebut. Kompleks ini kemudian diekspresikan pada permukaan sel sehingga dapat dikenali oleh sel T  $CD4^+$  (gambar 1)<sup>22,28</sup>.

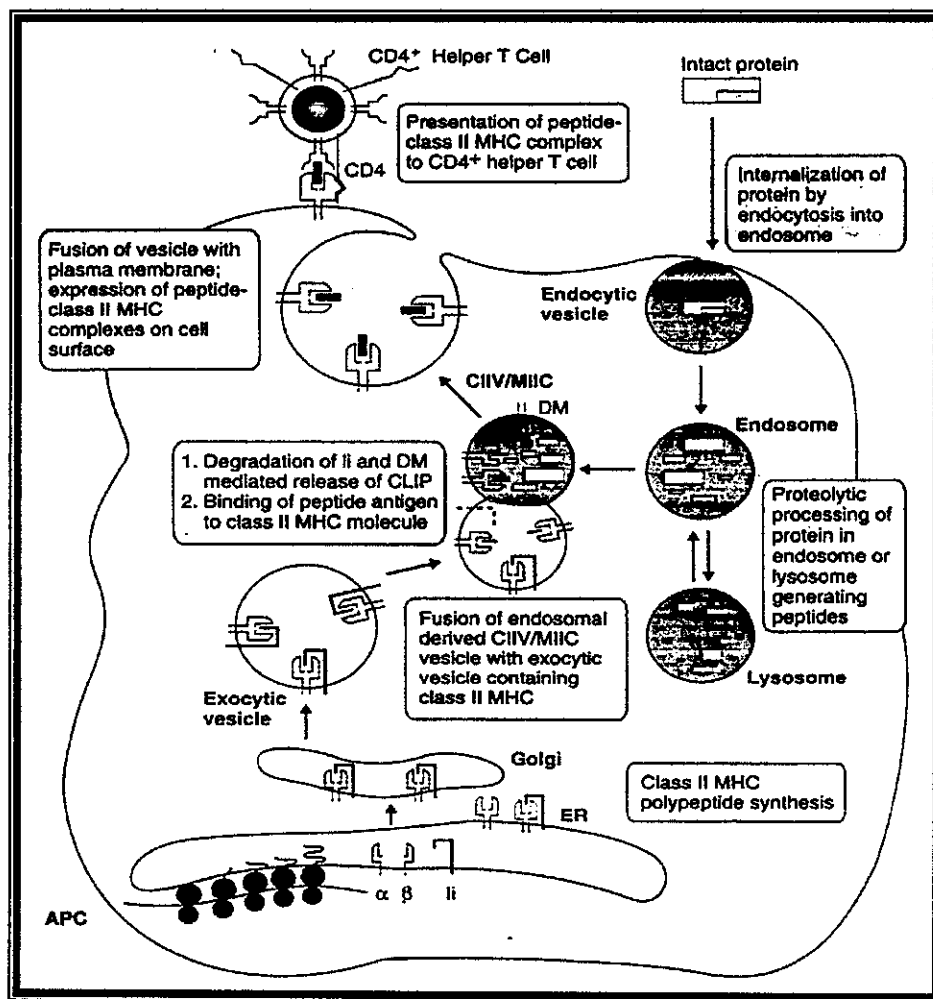
### **Presentasi antigen yang berasosiasi dengan MHC I**

Sel T  $CD8^+$  yang sebagian besar adalah CTL (*cytotoxic T lymphocyte*) mengenal fragmen peptida yang berasosiasi dengan molekul MHC kelas I pada permukaan sel target. Umumnya sel T ini mengenal protein asing yang disintesis di dalam APC, dan selanjutnya ditampilkan pada permukaan sel APC. Contoh protein yang disintesis endogenus adalah protein virus dan antigen tumor. Pemrosesan antigen, pengikatan dengan MHC I dan penampilan molekul pada permukaan membran APC mirip dengan antigen-MHC II<sup>22,28</sup>.

### **b. Fase Aktivasi**

Fase aktivasi dalam respons imun merupakan rangkaian peristiwa yang diinduksi oleh limfosit sebagai konsekuensi pengenalan antigen spesifik. Semua limfosit akan mengalami dua perubahan besar dalam merespons antigen. Pertama, mereka akan berproliferasi dan mengadakan amplifikasi sehingga bertambah banyak dan kedua, mereka mengalami diferensiasi ke dalam sel efektor yang berfungsi mengeliminasi antigen atau menjadi sel memori<sup>22,26</sup>.





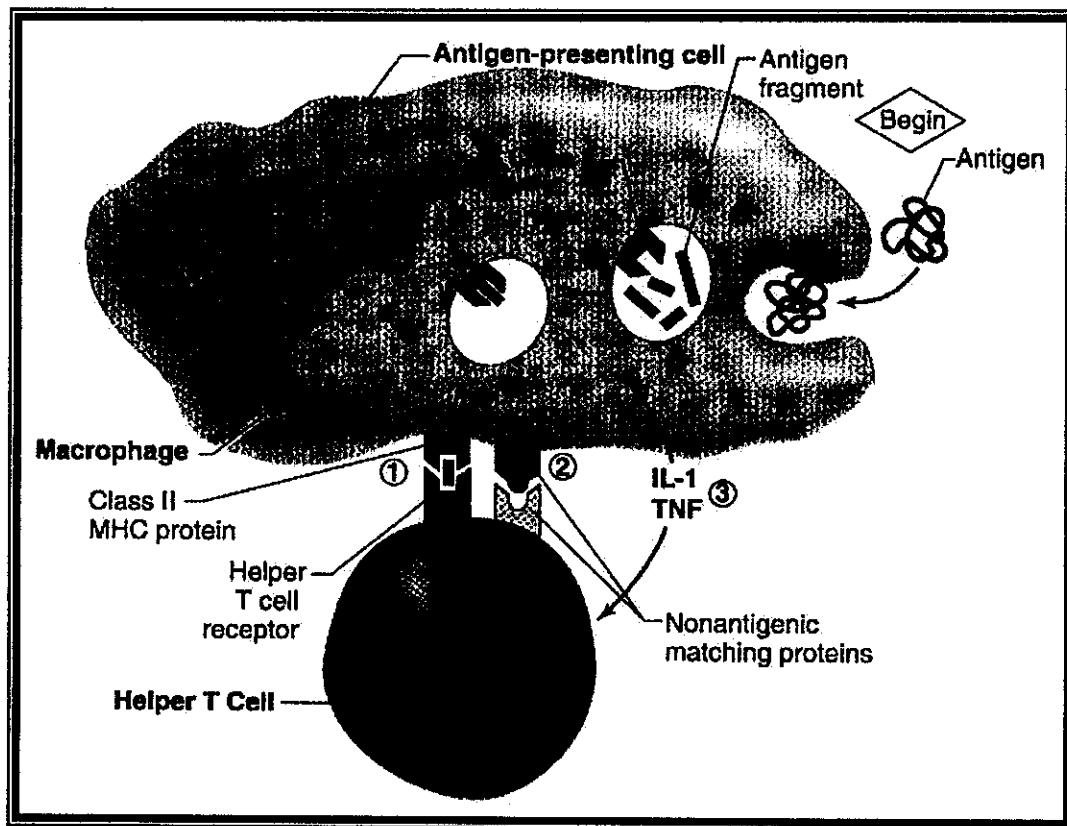
**Gambar 1.** Presentasi antigen yang berasosiasi dengan MHC II, (Abbas AK, et al., 1997)<sup>22</sup>

Aktivasi sel Th terjadi pada awal respons imun dan membutuhkan paling tidak dua sinyal. Sinyal pertama, berasal dari ikatan reseptor antigen sel T dengan kompleks peptida antigenik-MHC pada permukaan APC. Sinyal kedua, yaitu sinyal kostimulator yang juga membutuhkan kontak dengan APC<sup>22,29</sup>. Salah satu interaksi yang diketahui dapat membangkitkan sinyal kostimulasi adalah ikatan antara molekul

kostimulasi CD28 dan CTLA-4 dengan *ligandnya*. CD28 dan CTL-4, keduanya mempunyai struktur yang serupa dan *ligand* yang sama tetapi pola ekspresinya berbeda. CD28 diekspresikan pada sebagian besar sel T pada manusia, sebaliknya CTL-4 diekspresikan dengan kadar rendah atau tidak terdeteksi pada sel T tidak aktif. Perbedaan ekspresi kedua molekul ini mempunyai dampak fungsional untuk aktivasi dan inhibisi sel T<sup>26</sup>. Setelah teraktivasi, sel T kemudian akan menimbulkan respons biologis antara lain sekresi sitokin, proliferasi sel dan aktivitas fungsi efektor (regulator atau sitolitik). Dengan kata lain, kontak antara sel Th dengan APC akan menghantarkan rangkaian sinyal yang memperkuat fungsi imunologik kedua sel (gambar 2)<sup>29,30</sup>.

### c. Fase Efektor

Fase efektor respons imun merupakan tahap dimana limfosit yang secara spesifik diaktivasi oleh antigen dapat melaksanakan fungsi untuk mengeliminasi antigen. Limfosit yang berfungsi dalam fase efektor respons imun disebut sebagai sel efektor. Fase ini melibatkan diferensiasi sel T dan sel B yang dibangkitkan selama fase aktivasi, juga dipacu oleh respons imun non spesifik (alamiah). Contoh, antibodi mengikat antigen asing dan memperkuat fagositosis oleh neutrofil dan makrofag di dalam darah. Antibodi juga mengaktivasi sistem plasma protein (komplemen) yang berpartisipasi dalam melisis dan fagositosis mikroba<sup>22,27</sup>.



**Gambar 2.** Tiga proses aktivasi sel Th : 1). Presentasi Ag yang mengikat protein MHC II ke APC ; 2). Ikatan protein APC dan sel Th ; 3). Sekresi sitokin (IL-1 & TNF) (Vander A, et al., 2001)<sup>30</sup>.

### 2.1.2. Sel Makrofag

Makrofag diproduksi di sumsum tulang dari sel induk mieloid melalui stadium promonosit. Sel yang belum berkembang sempurna ini kemudian masuk ke dalam aliran darah sebagai monosit. Setelah 24 jam, sel monosit akan bermigrasi dari peredaran darah ke tempat tujuan di berbagai jaringan dan di sana berdiferensiasi sebagai makrofag. Namanya berbeda-beda sesuai jaringan yang ditempati tetapi

semuanya mempunyai persamaan yaitu dapat mengikat dan memakan partikel antigen. Sel-sel ini antara lain terdapat di paru-paru sebagai makrofag alveolar, di hati sebagai sel *Kupffer* yang berupa sel besar dengan banyak tonjolan sitoplasma, melapisi sinusoid limpa dan kelenjar limfe, sebagai sel mesangial dalam glomerulus, sel mikroglia otak dan sel osteoklast dalam tulang. Makrofag peritoneal bebas dalam cairan peritoneum. Kehadirannya disepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh dengan mudah<sup>23,26</sup>.

Masa hidup makrofag lama, dapat mencapai beberapa bulan bahkan tahun, jadi umurnya jauh lebih panjang dibandingkan sel-sel polimorfonuklear (PMN) yang hanya hidup selama 2-3 hari. Disamping itu fungsinya dalam sistem imun juga berbeda. Menurut fungsinya, makrofag dapat dibagi menjadi dua golongan, pertama sebagai fagosit profesional dan kedua sebagai APC. Tetapi ada pula makrofag yang memiliki kedua fungsi tersebut<sup>21</sup>.

#### **2.1.2.1. Fagosit Profesional**

Makrofag merupakan fagosit profesional yang terpenting. Makrofag memfagositosis partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati. Pengenal makrofag terhadap substansi asing dimungkinkan oleh adanya reseptor untuk fosfolipid sedangkan fungsi sebagai sel efektor yaitu menghancurkan mikroorganisme serta sel-sel ganas dan benda-benda asing dimungkinkan karena sel ini antara lain mempunyai sejumlah lisosom di dalam sitoplasma yang mengandung

hidrolase asam dan peroksidase yang merupakan enzim perusak yang dibutuhkan untuk pembunuhan intraseluler. Selain itu makrofag mempunyai reseptor terhadap fragmen FcIgG1 dan IgG3 serta IgE dan reseptor terhadap komponen seperti C3b pada permukaan sel, yang meningkatkan kemampuan fagositosis sel terhadap antigen yang dilapisi oleh antibodi atau komplemen. Dengan demikian makrofag merupakan "scavenger cell" utama dalam tubuh<sup>26,31</sup>.

Monosit dan makrofag juga mempunyai reseptor untuk interferon dan *migration inhibition factor* (MIF). Selanjutnya monosit dan makrofag dapat diaktifkan oleh *macrophage activating factor* (MAF) yang dilepas oleh sel T tersensitisasi. Disamping itu makrofag juga dapat melepaskan bahan-bahan seperti komplemen, interferon dan sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan non-spesifik dan spesifik<sup>26</sup>.

Makrofag mampu menelan antigen yang berbentuk partikel maupun yang larut, kemudian memprosesnya dengan cara degradasi, denaturasi atau modifikasi, dan selanjutnya menyajikan fragmen-fragmen antigen tersebut kepada sel T. Proses penelanan dan pencernaan antigen termasuk dari seluruh mikroorganisme patogenik ini disebut "fagositosis". Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya penyakit. Dalam kerjanya, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran kuman terjadi dalam beberapa tahap berurutan, sebagai berikut<sup>31,32</sup> :

- a. Kemotaksis, adalah gerakan fagosit ke tempat infeksi sebagai respons terhadap berbagai faktor seperti produk bakteri dan faktor biokimiawi yang lepas pada aktivasi komplemen.
- b. Adhesi, merupakan proses perlekatan membran plasma fagosit dengan permukaan mikroorganisme atau benda asing lain. Makrofag bisa dengan mudah memfagosit bakteri jika mereka dilapisi terlebih dahulu dengan protein plasma tertentu yang mendukung adhesi. Proses pelapisan ini disebut “opsonisasi” dan proteinnya disebut “opsonin” yang berupa beberapa komponen sistem komplemen dan molekul antibodi.
- c. Penelanan (*ingesti*). Proses penelanan bakteri terjadi karena fagosit membentuk tonjolan pseudopodia pada membran plasmanya, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri pada saat mereka ditangkap. Bakteri kemudian akan terkurung dalam kantung yang disebut fagosom (vakuola fagositik). Dinding fagosom dengan demikian terdiri atas dinding bagian luar fagosit.
- d. Pencernaan. Pada saat fagosom masuk ke sitoplasma, dia akan berhubungan dengan lisosom yang berupa granula intraselular yang berisi berbagai jenis enzim termasuk enzim digestif, protein dan substansi bakterisidal lain. Pada saat kontak fagosom dan lisosom bergabung membentuk fagolisosom. Enzim lisosom seperti lipase, protease, ribonuklease, deoksiribonuklease dapat menghidrolisa makrofag. Dalam beberapa detik setelah terjadinya fusi akan berlangsung degranulasi dan pembunuhan (*killing*) lewat proses *respiratory burst*. Enzim dan protein yang terdapat dalam granula mampu membunuh kuman, baik dengan proses oksidatif

maupun non-oksidatif. Mekanisme mana yang lebih dominan bervariasi bergantung pada jenis mikroba, status metabolik dan kondisi yang menguntungkan salah satu mekanisme.

#### **2.1.2.2. Aktivasi Makrofag**

Aktivasi makrofag merupakan fenomena yang kompleks. Beberapa alasan yang diduga menjadi penyebab kompleksitas ini, diantaranya<sup>26</sup> :

- Makrofag yang teraktivasi dapat melakukan berbagai fungsi efektor, misalnya aktivasi limfosit, mikrobisidal, tumorisidal, inflamasi serta demam dan reorganisasi jaringan.
- Seri monosit/makrofag terdiri atas sel yang sangat heterogen, dan sel yang berasal dari lokasi yang berbeda menunjukkan ciri-ciri yang berbeda dalam hal ekspresi MHC dan reseptor Fc, respons terhadap limfokin dan produksi peroksidase.
- Aktivasi fungsi makrofag tidak hanya bergantung pada makrofag tetapi juga dipengaruhi oleh jenis dan interaksi sinergistik berbagai limfokin dan regulator inflamasi yang dihadapinya.

Diduga bahwa aktivasi makrofag berlangsung dalam beberapa fase yang memerlukan stimuli berurutan, mencakup limfokin, endotoksin, dan berbagai mediator serta regulator inflamasi. Setiap fase yang menunjukkan fungsi efektor yang berbeda, dan penampilan maupun fisiologi makrofag juga menunjukkan

karakteristik yang berbeda. Makrofag teraktivasi akan memperlihatkan aktivitas dan fungsi dalam berbagai hal, diantaranya :

a. Makrofag teraktivasi berperan penting dalam fase-fase respons imun spesifik.

Pada hakekatnya makrofag terlibat dalam semua fase respons imun, dimulai dengan menangkap antigen, memprosesnya lalu menyajikan antigen yang telah diproses dan diikat pada MHC kelas II kepada sel Th, dengan demikian makrofag berfungsi mengaktivasi limfosit lewat peningkatan efisiensinya sebagai APC. Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efektor hanya setelah sel itu diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. IFN- $\gamma$  merupakan sitokin dominan selama reaksi imun yang didominasi oleh sel Th1, berpartisipasi penting selama presentasi antigen dan merupakan sitokin pengaktivasi makrofag prototipikal. IL-12 dan IL-18 yang juga diproduksi terutama oleh makrofag akan menginduksi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel T dan sel NK, merupakan sitokin kunci yang mengantarkan diferensiasi sel Th1 yang sangat berperan dalam respons melawan patogen intraseluler seperti *L. monocytogenes*<sup>33,34,35</sup>.

b. Makrofag teraktivasi akan memacu respons inflamasi dengan mensekresikan mediator inflamasi. Disamping mempunyai reseptor untuk berbagai jenis limfokin misalnya reseptor untuk MIF dan IFN- $\gamma$ , makrofag juga memproduksi sitokin yang mempengaruhi sel-sel inflamasi lain, khususnya netrofil, dan bertanggung jawab atas berbagai dampak sistemik inflamasi misalnya demam<sup>22,35</sup>.



- c. Makrofag teraktivasi akan menunjukkan fungsinya dalam reorganisasi jaringan yang rusak. Sehubungan dengan fungsi ini maka makrofag akan mensekresikan faktor yang penting diantaranya berupa faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), faktor endotel vaskuler (*Angiogenesis factor*), *elastases* dan *collagenases*<sup>22,33</sup>.
- d. Makrofag teraktivasi akan meningkatkan aktivitas antimikroba. Makrofag yang teraktivasi menunjukkan kemampuan yang meningkat untuk membunuh beberapa jenis mikroorganisme, tetapi peningkatan kemampuan membunuh ini tidak berlaku bagi sel sasaran yang lain. Sebagai contoh, kemampuan makrofag untuk membunuh *L.monocytogenes* meningkat tanpa peningkatan kemampuan untuk membunuh sel tumor atau mikobakteria. Proses puncak respons fagositosis oleh makrofag adalah pembunuhan terhadap bakteri / mikroorganisme. Kemampuan membunuh ditunjukkan dengan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) melalui jalur *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang dibangkitkan dengan *respiratory burst*. Makrofag mencit seperti juga makrofag manusia dapat diaktivasi oleh IFN- $\gamma$  untuk mengekspresikan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang mengkatalisis produksi NO dari arginin. Pelepasan NO oleh makrofag berperan dalam pembunuhan patogen intraseluler<sup>26,35</sup>.
- e. Makrofag teraktivasi akan meningkatkan kemampuannya dalam aktivitas antitumor. Makrofag merupakan mediator seluler yang potensial dalam imunitas anti tumor. Makrofag yang diaktivasi dapat melisis sel tumor tetapi tidak sel normal *in vitro*. Seperti halnya sel NK, makrofag mengekspresikan reseptor Fc- $\gamma$

dan aktivitasnya dapat diarahkan kepada tumor yang dilapisi antibodi. Besar kemungkinan bahwa mekanisme pembunuhan sel tumor sama dengan mekanisme pembunuhan mikroba patogen, yaitu dengan melepaskan enzim lisozom, ROI dan RNI. Makrofag teraktivasi juga memproduksi TNF. TNF merusak sel tumor dengan efek toksik langsung atau secara tidak langsung dengan merusak pembuluh darah di dalam tumor<sup>26</sup>.

## **2.2. *LISTERIA MONOCYTOGENES***

### **2.2.1. Aspek Bakteriologi**

*Listeria monocytogenes* termasuk salah satu spesies dalam genus *Listeria* yang merupakan bakteri penting penyebab penyakit listeriosis pada manusia dan hewan. Bakteri ini bentuknya teratur, berbentuk batang pendek, gram-positif, tidak membentuk spora, berdiameter 0,4 - 0,5  $\mu\text{m}$  dengan panjang 0,5 - 2  $\mu\text{m}$  (tabel 1)<sup>36</sup>.

*L.monocytogenes* tumbuh pada perbenihan misalnya agar *Mueller Hinton*. Identifikasi makin mudah kalau biakan pertama dikerjakan pada agar yang mengandung darah biri-biri, karena akan terlihat daerah kecil hemolisis yang khas di sekitar dan di bawah koloni. Koloni berdiameter 0,5 - 1,5 mm setelah 24 - 48 jam. Isolasi dapat ditingkatkan kalau jaringan disimpan pada suhu 4° C selama beberapa hari sebelum diinokulasikan ke dalam perbenihan bakteriologi. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob dan katalase positif, membentuk asam tetapi tidak membentuk gas

dalam berbagai jenis karbohidrat. Pertumbuhan terjadi pada temperatur 1°C - 45°C dengan pH 6 - 9 dan dalam nutrien air daging mengandung > 10 % NaCL.

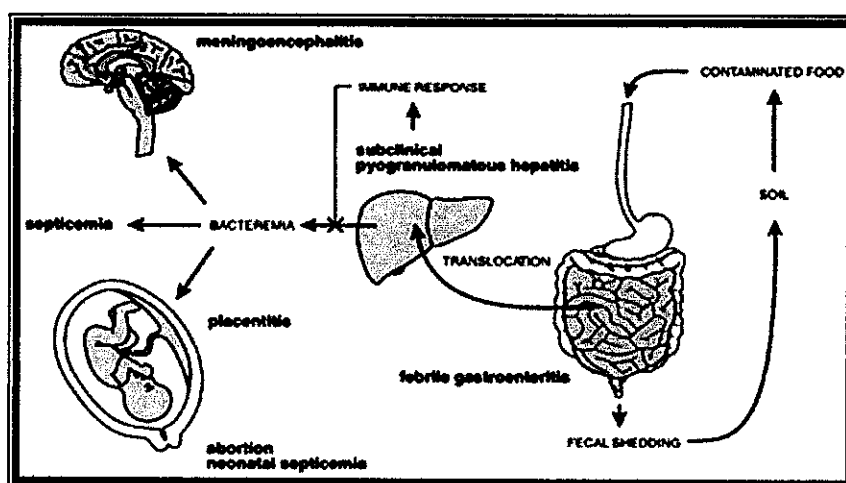
**Tabel 1.** Spesies dalam genus *Listeria* dan sifat bakteriologisnya (Unnerstand H, 2001)<sup>36</sup>.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	<i>L. ivanovii</i> Subsp. <i>londoniensis</i>
Gram positif rod	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Production							
Tumbling motility	+	+	+	+	+	+	+
Haemolysis	+	-	+	-	-	+	+
L-rhamnose	+	d	-	d	-	-	-
D-xylose	-	-	+	+	-	+	+
CAMP-test ( <i>Stap. aureus</i> )	+	-	+	-	-	-	-
CAMP-test ( <i>Rhodococcus equi</i> )	-	-	-	-	-	+	+
Ribose						+	-
N-acetyl-β-D-mannosamine						-	+

Saat dikultur pada media dengan suhu 20 - 25° C selama 6 - 20 jam, bakteri akan memperlihatkan motilitas jungkir balik yang karakteristik, tetapi motilitas ini tidak terlihat pada suhu 37° C. Ahli yang lain menyebutkan kisaran pertumbuhan bakteri ini pada -4°C - 37°C sehingga *L.monocytogenes* umumnya ditemukan pada makanan yang disimpan di dalam lemari pendingin baik yang belum diolah maupun yang sudah diproses<sup>36,37,38,39</sup>.

### 2.2.2. Faktor Virulensi

Meskipun listeriosis merupakan penyakit invasif dengan CFR tertinggi dari seluruh penyakit yang tersebar lewat makanan<sup>13,17,18</sup>, namun patofisiologi infeksi *L.monocytogenes* pada manusia dan hewan masih sedikit sekali dipahami (gambar 3).



**Gambar 3.** Skema patofisiologi infeksi *L.monocytogenes* (Vazquez-Boland JA, et al., 2001)<sup>12</sup>

Informasi paling banyak berasal dari interpretasi epidemiologik, klinik dan penemuan histopatologik serta pengamatan infeksi secara eksperimental pada hewan terutama mencit sebagai model<sup>12</sup>. Derajat dan angka progresi dari penyakit selain ditentukan oleh faktor resiko, jumlah bakteri yang termakan dan tingkat virulensi kuman, juga sangat dipengaruhi oleh tingkat imunitas individual pejamu<sup>12,17</sup>.

Beberapa faktor virulensi *L.monocytogenes* berperan dalam proses infeksi dan mempengaruhi jalur-jalur transduksi sinyal yang memperkuat penyebaran infeksi dari sel pejamu. Faktor-faktor tersebut antara lain :

### Internalin

*L.monocytogenes* dibawa masuk ke dalam sel pejamu melalui proses fagositosis. Beberapa sel seperti makrofag normalnya memfagosit bakteri dan sel yang akan mati, sementara sel endotel dan sel epitelial lain merupakan fagosit non profesional. Sel-sel nonprofesional ini normalnya tidak memfagosit sel lain, tetapi mereka dapat diinduksi untuk maksud tersebut. *Internalin A*, diidentifikasi pertama kali sebagai protein permukaan listerial yang dibutuhkan untuk penetrasi *L.monocytogenes* ke dalam sel non fagositik, seperti sel epitelial. Faktor virulensi ini mengikat protein permukaan, *E-cadherin*, pada permukaan sel epitelial pejamu. Interaksi ini yang rupanya menstimulasi fagositosis sel *L.monocytogenes*. Sedangkan *Internalin B*, suatu protein yang berkaitan, berperan dalam invasi ke sel hepatosit di dalam hepar. Masih terdapat kontroversi di dalam literatur, protein yang mana yang lebih penting dalam invasi ke tipe sel berbeda dan apakah keduanya diperlukan untuk masuknya bakteri ke dalam makrofag<sup>11,13,40</sup>.

### Listeriolysin O

Pada waktu *L.monocytogenes* ditangkap, bakteri ini akan terperangkap di dalam vakuola yang dikelilingi oleh membran. Sel fagositik profesional mulai segera memfagositosisnya dan kelangsungan hidup patogen ini bergantung pada kemampuannya melepaskan diri dari vakuola.

*Listeriolysin O* (LLO), suatu toksin pembuat lubang bakterial, merupakan bahan dasar untuk melisiskan membran vakuola dan memungkinkan *L.monocytogenes* mengelak ke dalam sitoplasma sel. LLO dibutuhkan untuk terjadinya infeksi pada mencit percobaan dan aktivitasnya diperkuat oleh keasaman (pH) di dalam vakuola. LLO juga bekerja sebagai stimulator inflamasi melalui induksi aktivasi sel endotelial dan aktivasi netrofil<sup>13,41,42</sup>.

#### **Protein ActA**

*L.monocytogenes* yang berhasil menghindari dari vakuola akan masuk ke sitoplasma dan berreplikasi di dalamnya. Untuk memudahkan bakteri ini bergerak langsung ke sel lain, protein permukaan *ActA* akan menginduksi polimerisasi molekul *aktin globuler* untuk membentuk filamen aktin terpolarisasi. Sel bakteri kemudian bergerak disepanjang filamen ini ke membran sel dan menyebabkan bagian membran menonjol keluar, membentuk struktur yang disebut "listeriopods". Tonjolan ini ditangkap oleh sel tetangganya dan dengan cara ini listeria menyebar tanpa harus bersentuhan dengan antibodi atau molekul imunoaktif yang lain<sup>12,13,43</sup>.

#### **2.2.3. Multiplikasi di dalam Hepar**

Organisme *L.monocytogenes* yang menembus barrier intestinal dibawa oleh aliran limfe/darah ke nodus limfatikus mesenterik, lien dan hepar. Di dalam hepar terutama pada sel hepatosit kuman secara aktif bermultiplikasi sampai infeksi dikontrol oleh respons imun seluler. Sebenarnya ada dua cara yang memungkinkan bagi patogen intraseluler ini untuk masuk ke parenkim hepar setelah translokasi



intestinal, yaitu lewat sel *Kupffer* (penyebaran dari sel ke sel) atau lewat invasi langsung ke hepatosit<sup>12,15</sup>.

Infeksi pada mencit percobaan lewat pemberian intravena menunjukkan bahwa *L.monocytogenes* dengan cepat keluar dari aliran darah menuju ke organ hepar dan lien. Sebagian besar (90 %) beban bakteri terakumulasi di dalam hepar, rupanya ditangkap oleh sel *Kupffer*. *Resident macrophage* ini membunuh sebagian besar bakteri, mengakibatkan penurunan jumlah populasi bakteri yang dapat hidup di dalam hepar selama 6 jam pertama setelah infeksi. Sel *Kupffer* dipercaya menginisiasi perkembangan imunitas antilisterial melalui induksi proliferasi limfosit T bergantung antigen dan sekresi sitokin. Tidak semua sel *L.monocytogenes* dirusak oleh jaringan makrofag dan bakteri yang bertahan mulai tumbuh, jumlahnya meningkat selama 2 sampai 5 hari pasca infeksi di dalam organ hepar mencit<sup>12,44</sup>.

Untuk dapat dihancurkan oleh makrofag yang teraktivasi kuman ini perlu dikeluarkan dulu dari sel hepatosit. Pengeluaran dari hepatosit dilakukan dengan menghancurkan sel-sel ini oleh leukosit yang berkumpul di sekitar tempat yang terinfeksi dan melakukan degranulasi ekstraseluler. Ini menegaskan bahwa lisis hepatosit terinfeksi oleh sel fagositik merupakan strategi pertahanan dini yang umum melawan infeksi. Eksperimen pada mencit menunjukkan bahwa aktivasi netrofil PMN di dalam hepatosit adekuat untuk mengeliminasi *L.monocytogenes* dari hepar, mungkin berkoordinasi dengan respons imun alamiah lokal. Dua sampai 4 hari setelah infeksi, netrofil diganti secara bertahap oleh sel MN yang berasal dari darah bersama-sama dengan limfosit untuk membentuk granuloma karakteristik<sup>15,45</sup>.

Pada individu yang normal, paparan terus-menerus dengan antigen listerial mungkin berperan dalam membentuk sel T memori anti listerial. Sebaliknya, pada individu yang immunokompromis, dimana respons imun untuk mengontrol infeksi tidak adekuat maka proliferasi *L.monocytogenes* tidak dapat dibatasi di dalam parenkim hepar sehingga melepaskan bakteri ke dalam sirkulasi. Hal ini mengakibatkan keadaan bakteremia jangka lama dan kuman akan menginvasi organ target sekunder yang lebih disukai (otak dan atau uterus wanita hamil)<sup>12</sup>.

#### **2.2.4. Respons Imun Terhadap *L.monocytogenes***

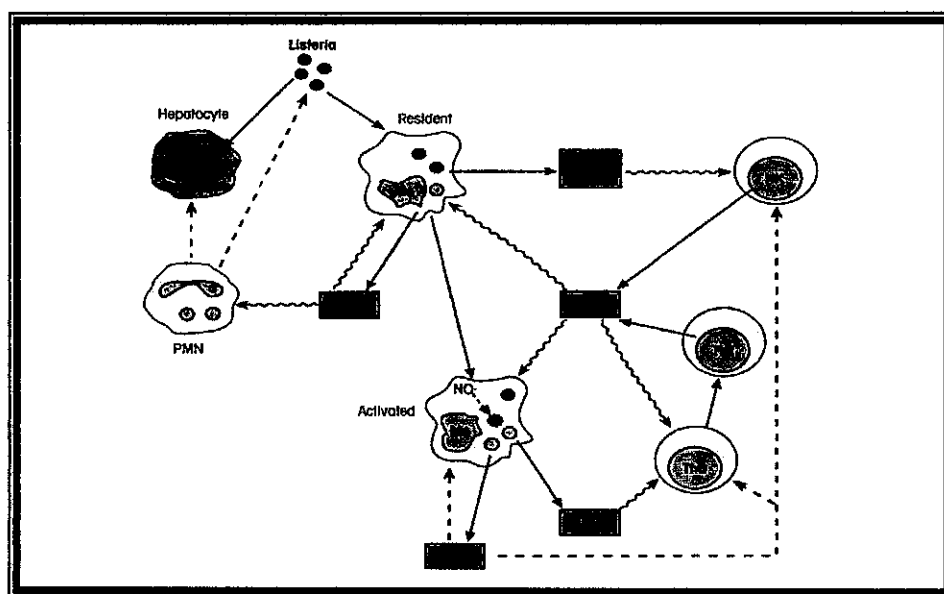
Respons imun sebagai pertahanan pejamu melawan *L.monocytogenes*, patogen intraseluler fakultatif, dikontrol oleh imunitas seluler dengan limfosit T CD4<sup>+</sup> subset Th1 yang mengaktivasi makrofag dan diatur oleh sitokin-sitokin endogen<sup>9,14,46,47</sup>. Aktivitas sel-sel sistem imun dan protein melawan patogen dapat digambarkan sebagai berikut (gambar 4) :

##### **Netrofil dan Makrofag**

Suatu hasil penelitian mengindikasikan bahwa respons inflamasi cepat merupakan unsur kunci dalam penanggulangan infeksi *L.monocytogenes*. Selama stadium awal listeriosis, netrofil dan makrofag bermigrasi ke lien dan hepar, merusak sebagian besar sel listerial yang muncul dari usus halus. Selama tahap awal kolonisasi bakteri, netrofil PMN ditarik ke tempat infeksi, membentuk mikroabses dengan ciri-ciri tersendiri. Netrofil menunjukkan memainkan peran penting dalam



mengontrol fase akut dan dalam memediasi destruksi hepatosit terinfeksi *in vivo*. Hepatosit bereaksi terhadap infeksi *L.monocytogenes* dengan melepaskan kemotaktan netrofil dan memperlihatkan peningkatan dalam adhesi terhadap netrofil, menyebabkan pembentukan mikroabses. Namun beberapa kuman dapat mengelak dari invasi sel hepatosit. Netrofil juga ditarik ke unit utero-plasental dan susunan saraf pusat untuk membunuh *L.monocytogenes* yang invasi ke organ ini<sup>12,16,48,49</sup>.



**Gambar 4.** Respons imun terhadap infeksi *L.monocytogenes* (Roitt IM, et al., 2001)<sup>47</sup>

Walaupun netrofil dan makrofag bisa menempel dan melisiskan sel-sel yang mengandung *L.monocytogenes*, beberapa makrofag tidak dapat membunuh kuman ini. Makrofag yang mengijinkan kuman bertahan di dalamnya mengandung IL-10 pada permukaannya. Hal ini diketahui menekan fungsi makrofag. Respons inflamasi

awal penting untuk membatasi pertumbuhan dan penyebaran bakteri ini di dalam tubuh, tetapi tidak cukup untuk membunuh seluruh *L.monocytogenes*<sup>13</sup>.

Pertahanan pejamu melawan patogen intraseluler juga bergantung pada kemampuan makrofag untuk mensintesis NO dan ROI. Tetapi peran ROI dan RNI terhadap "intracellular killing" *L. monocytogenes* oleh makrofag teraktivasi masih diperdebatkan<sup>46,50</sup>. Ohya *et al.* (1998) menyimpulkan lewat suatu penelitian bahwa penghambatan produksi ROI secara drastis mempengaruhi kemampuan *killing* sementara penghambatan produksi RNI efeknya dapat diabaikan. Peran ROI dan RNI pada mekanisme listerisidal makrofag ternyata berbeda antara makrofag yang diaktivasi pada tahap prainfeksi dengan pasca infeksi. Pfister *et al.* (2002)<sup>50</sup> dan Ouadrhiri *et al.* (1999)<sup>51</sup> menunjukkan bahwa RNI juga penting dalam mekanisme ini. NO banyak dibangkitkan oleh iNOS yang diinduksi dalam makrofag dan sel lain di bawah pengaruh sitokin dan unsur pokok yang berasal dari patogen. Namun mereka mengemukakan bahwa NO merupakan dasar pokok untuk eliminasi *L.monocytogenes* pada rodent tetapi tidak pada manusia. Ini sejalan dengan Remer *et al.* (2001)<sup>52</sup> yang membuktikan bahwa mekanisme anti listerial pada otak tikus putih bayi yang terkena meningoensefalitis listerik ditentukan juga oleh produksi NO makrofag.

### Sitokin

Sejumlah sitokin, molekul kecil yang mengkoordinasikan sel dan aktivitas sistem imun, terlibat dalam reaksi anti *L.monocytogenes*. Termasuk disini adalah

IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, TNF dan IFN- $\gamma$ . Sitokin lain, yakni IL-4 dan IL-10 justru mengurangi ketahanan terhadap *L. monocytogenes*. Interaksi sel endotel dengan kuman ini meningkatkan sintesis IL-18 dan *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang menarik limfosit T, monosit dan netrofil. IL-6 yang menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel T juga diproduksi dan jumlahnya meningkat secara eksponensial pada mencit dengan meningkatnya jumlah *L.monocytogenes*<sup>13</sup>.

Makrofag yang terinfeksi *L.monocytogenes* akan berespons dengan memproduksi IL-12, yang kemudian menginduksi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel NK dan sel T CD4<sup>+</sup>. IFN- $\gamma$  bekerja secara sinergis dengan produk bakteri untuk memaksimalkan fungsi efektor makrofag teraktivasi dan sekresi sitokin inflamasi mereka. Pada gilirannya IFN- $\gamma$  menginduksi produksi IL-12 di dalam makrofag sehingga memperkuat mekanisme bakterisidal makrofag untuk membatasi replikasi *L. monocytogenes* di dalam sel ini<sup>14,47,53</sup>. Selama infeksi primer, IFN- $\gamma$  disekresikan terutama oleh sel NK yang distimulasi dengan IL-1 $\alpha$ , IL-12 dan TNF- $\alpha$  yang disekresi oleh makrofag. Sebaliknya, sumber utama IFN- $\gamma$  selama infeksi sekunder berasal dari sel T CD4<sup>+</sup> spesifik antigen<sup>46</sup>.

Hasil serupa juga diperlihatkan pada studi oleh *Anderson et al.* (1998) dimana sel NK dapat dengan cepat memproduksi IFN- $\gamma$ , jadi berpartisipasi dalam lingkaran IFN- $\gamma$  - IL-12. Mencit yang kekurangan sel T dan B matur tetapi mempunyai sel NK yang normal mampu mengontrol infeksi primer listeriosis<sup>53</sup>. Selain itu, mencit

yang kekurangan IL-12 dan IL-18 pada sel-sel liennya tidak pernah memproduksi IFN- $\gamma$  setelah distimulasi dengan *Listeriolysin O* (LLO). Hal ini jelas mengindikasikan bahwa LLO (salah satu faktor virulensi *L. monocytogenes*) mampu menginduksi IFN- $\gamma$  dari sel NK lewat induksi IL-12 dan IL-18 dari makrofag<sup>54</sup>. Peran yang sangat penting lingkaran IFN- $\gamma$  - IL-12 dalam proteksi melawan bakteri ini ditunjukkan melalui peningkatan kerentanan melawan mencit yang kekurangan IFN- $\gamma$ , reseptor IFN- $\gamma$ , komponen sinyal IFN- $\gamma$  dan IL-12, juga pada tikus yang diberi antibodi netralisasi anti IL-12 terhadap patogen ini<sup>55</sup>.

Produksi berlebihan IL-10 oleh makrofag ternyata meningkatkan kerentanan mencit neonatus terhadap listeriosis<sup>56</sup>, sedangkan IL-4 endogen terlibat dalam penekanan ketahanan pejamu melawan infeksi *L.monocytogenes* pada mencit yang kehilangan IFN- $\gamma$  tetapi IL-10 tidak dapat dibuktikan<sup>57</sup>.

### Limfosit T

Imunitas seluler spesifik yang diperantarai sel T jika berfungsi secara optimal dapat mendeteksi dan mengeliminasi kuman *L.monocytogenes* yang berhasil menghindar dari netrofil dan makrofag. Sudah jelas bahwa baik sel T CD4<sup>+</sup> maupun CD8<sup>+</sup> diaktivasi secara spesifik selama terjadinya infeksi<sup>13,47,58,59</sup>.

Penelitian menggunakan mencit yang mengalami defisiensi molekul MHC kelas I dan MHC kelas II memperlihatkan peran penting sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> dalam respons imun primer dan sekunder terhadap *L.monocytogenes*, dimana pembangkitan sel CD8<sup>+</sup> yang spesifik terhadap antigen nampaknya berperan pada fase infeksi

primer untuk mengeliminasi bakteri secara lengkap dan untuk membangun respons memori yang berikut<sup>14</sup>.

Pemahaman bagaimana sel T CD4<sup>+</sup> berfungsi dalam respons imun terhadap *L.monocytogenes* dan bagaimana protein bakteri diproses dalam kompleks peptida-MHC II didalam sel terinfeksi berhasil diidentifikasi lewat suatu studi yang menunjukkan bahwa protein permukaan *L.monocytogenes* dapat menghasilkan peptida untuk presentasi oleh molekul MHC II yang merupakan target spesifik bagi sel T CD4<sup>+</sup> selama infeksi listeria pada tikus<sup>59</sup>.

Sel yang terinfeksi dengan *L.monocytogenes* di dalam sitoplasmanya memproses protein listerial seperti *hemolisin* LLO didalam peptida dan mempresentasikannya kepada molekul MHC kelas I pada permukaan sel. Sel T CD8<sup>+</sup> kemudian mengenali sel yang terinfeksi ini dan melisiskan mereka. Ini merupakan jalur utama untuk destruksi hepatosit terinfeksi pada mencit<sup>10,13</sup>. Lebih jauh lagi, jalur molekul dimana sel T CD8<sup>+</sup> memediasi sitolisis telah berhasil diidentifikasi. Salah satunya adalah jalur eksositosis granula yang membutuhkan koordinasi *perforin* dan *granzim*, dimana kedua granula ini ditemukan di dalam sel T CD8<sup>+</sup> teraktivasi untuk mengaktifkan kaskade-kaskade sel target dan menginduksi apoptosis<sup>10</sup>.

Data terbaru menunjukkan bahwa produk bakteri atau imunogen bisa langsung mengaktivasi APC melalui "reseptor toll-like". Pada keadaan ini respons sel T CD8<sup>+</sup> yang spesifik selama infeksi *L.monocytogenes* kurang bergantung pada

bantuan sel T CD4<sup>+</sup> lewat interaksi *ligand* CD40-CD40 tetapi melibatkan kostimulasi lewat interaksi *ligand* CD137-CD137 dan B7-CD28<sup>60</sup>.

### 2.3. *ALLIUM SATIVUM* L.

#### 2.3.1. Sinonim dan Taksonomi

*Allium* berasal dari bahasa Latin yang berarti bawang putih, sedangkan *sativum* berarti bercocok tanam. Bawang putih memiliki banyak nama karena setiap negara memberinya nama berbeda-beda. Nama lain *A.sativum* antara lain *shoum* (Yahudi), *thoum* (Arab), *aglio* (Perancis), *launc* (Jerman), dan *garlic* (Inggris)<sup>4</sup>.

*A.sativum* bergabung dengan kelompok tanaman umbi-umbian lain dan termasuk dalam familia *Liliaceae* (keluarga bunga bakung). Tumbuhan ini adalah satu-satunya jenis tanaman umbi-umbian yang dianggap sebagai simbol kesucian<sup>4,61,62</sup>.

#### 2.3.2. Morfologi Tumbuhan

*A.sativum* merupakan tanaman tegak dengan tinggi 30-60 cm membentuk rumpun. Tidak memiliki akar tunggang, hanya akar serabut yang tidak panjang, tidak terlalu dalam masuk ke dalam tanah. Daun berbentuk pipih, rata dan agak melipat ke dalam ke arah membujur, helai daun bisa lebih dari 10 helai, memiliki bunga berwarna ungu yang tumbuh dari atas tangkai dan menempel pada pelepah daun. Pelepah-pelepahnya saling membungkus hingga membentuk batang semu, bagian

pangkalnya membentuk selaput tipis yang membungkus umbi kecil-kecil. Pada pangkal tanaman terdapat umbi yang berada di dalam tanah, tiap umbi terdiri dari siung-siung kecil<sup>62</sup>.

Umbi lapis ini (*Allii sativi bulbosus*) berupa umbi majemuk berbentuk hampir bundar, garis tengahnya 4 cm sampai 6 cm, terdiri atas 8 sampai 20 siung yang seluruhnya dilapisi 3 sampai 5 selaput tipis serupa kertas berwarna putih. Tiap siung diselubungi oleh dua selaput serupa kertas, selaput luar warna agak putih dan agak longgar<sup>61,63</sup>.

Beberapa varietas bawang putih yang tumbuh di Indonesia, misalnya varietas unggul *Lumbu hijau*, *Lumbu kuning*, *Ilocos*, *Gombloh*, *Layur*, dan lain-lain<sup>62</sup>.

### 2.3.3. Habitat

*A.sativum* bisa tumbuh dimana saja di wilayah beriklim sedang, subtropis dan tropis, kecuali di wilayah Artik dan hutan khatulistiwa berembun. Tanaman ini memang selalu menjadi bagian dari kehidupan orang-orang yang mendiami wilayah pegunungan. Para penduduk di wilayah itu sering mengunyah butiran bawang putih ketika hendak melakukan perjalanan jauh guna menghangatkan badan atau sebagai penangkal rasa sakit akibat hawa dingin<sup>4</sup>.

*A.sativum* dapat ditanam secara khusus atau cukup mencampurnya dengan tanaman lain. Tidak diperlukan lahan khusus, demikian juga perawatannya tidak terlalu sulit. Umbi-umbian yang banyak dimanfaatkan sebagai bumbu masak ini bukan ditanam dengan cara disemai melainkan ditanam butir per butir<sup>61</sup>.

Beberapa ahli berpendapat bahwa *A.sativum* yang ditanam di tanah organik biasanya lebih kecil namun memiliki rasa dan mengandung obat yang tinggi. Disamping itu juga cenderung tidak mudah membusuk. Waktu bercocok tanam hendaknya dilakukan pada akhir musim semi. Bisa juga pada pertengahan musim semi. Kondisi tanah yang cocok adalah lahan basah namun tidak terlalu subur dan mendapatkan cahaya matahari yang cukup. Lahan basah lebih cocok karena mengandung sulfur dan sulfida yang menjaga keutuhan aroma dan rasanya<sup>4,61</sup>.

#### 2.3.4. Kandungan Kimia

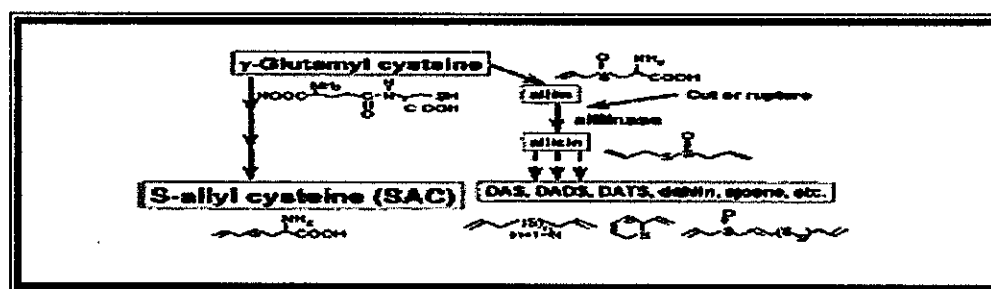
*A.sativum* yang utuh secara keseluruhan mengandung 0,1-0,3 % minyak mudah menguap dengan unsur pokok utama terdiri atas sulfur, berupa  $\gamma$ -glutamyl-S-allyl-L-cysteines, *alliin* (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) dan *methiin* (S-methyl-L-cysteine sulfoxide). Zat yang mudah menguap khas dalam *A. sativum* mentah dan minyak esensialnya adalah *allicin*, *diallyl sulfide* (DAS), *diallyl disulfide* (DADS), *diallyl trisulfide*, *methyl allyl disulfide*, *methyl allyl trisulfide*, *2-vinyl-1,3-dithiin*, *3-vinyl,1,2 dithiin* dan *E,Z-ajoene*. Senyawa-senyawa ini umumnya bertanggung jawab untuk sebagian besar perangkat farmakologik *A. sativum*<sup>64,65</sup>.

Kandungan DAS sebesar 60 % membuat *A.sativum* memiliki bau yang khas menyengat. Saat dikupas namun tidak sampai merusak jaringannya maka tidak akan berasa dan berbau. Ia baru akan menampilkan sifat aslinya setelah dipotong atau ditumbuk. Jaringan yang berfungsi sebagai penutup senyawa sulfur sumber bau dan



rasa menyengat itu adalah *diallyl-thiolphinate* yang lebih umum disebut *Allicin*. Sifat *allicin* terlalu reaktif dan cenderung tidak stabil. Dalam beberapa hari ia berubah menjadi senyawa sulfur berminyak dan berbau<sup>4,66</sup>.

*Scoil* dan *Seebeck*, ahli kimia asal Swiss, berhasil mengisolir kristal asam amino yang kaya akan sulfur yang disebut *Alliin*. Selama penyimpanan umbi ini pada temperatur sejuk, *alliin* terakumulasi secara alamiah. Rata-rata umbi *A.sativum* terdiri dari 0,9 %  $\gamma$ -glutamylcysteine dan lebih dari 1,8 % *alliin*<sup>65</sup>. Salah satu jenis asam amino di dalam tubuh adalah *Cysteine* yang mengandung sulfur. Zat ini membantu terbentuknya semua jenis asam amino yang mengandung sulfur pada *A.sativum*. Pada penelitian ditemukan adanya perubahan bentuk dari *alliin* menjadi *allicin* oleh kerja enzim *allinase* sebagai katalisator (gambar 5)<sup>4,67</sup>.



**Gambar 5.** Transformasi dan struktur kimia unsur pokok aktif *A. sativum* (Amagase H, et al., 2001)<sup>65</sup>.

Saat *A.sativum* diproses dengan memotong atau digerus, senyawa di dalamnya akan diubah menjadi seratus senyawa organosulfur dalam waktu singkat<sup>65</sup>. Ketika dipanaskan dengan air dan bahan pelarut (aseton) maka kandungan *allicinnya* akan

berubah bentuk menjadi suatu senyawa yang disebut *ajoene*<sup>4,68</sup>. Bawang putih yang dipanaskan atau dibuat kapsul akan berubah menjadi minyak, sementara yang ditumbuk dalam keadaan segar tetap mengandung *allicin* asli<sup>4</sup>.

Disamping unsur-unsur pokok di atas, setiap *A.sativum* mengandung rata-rata 60 % air, 1g karbohidrat, 16,8 % (0,2 g) protein, 0,05g serat, 0,01g lemak, vitamin (A, B1, B2, B6, C dan E), trace mineral konsentrasi tinggi (khususnya selenium), asam nikotik, fosfolipid, flavonoid, fenol, asam amino esensial serta 10 jenis gula berbeda (4 diantaranya adalah glukosa, fruktosa, arabinosa dan inulin)<sup>4,64,65</sup>.

### 2.3.5. Preparat Ekstrak

Untuk membuat ekstrak *A.sativum*, butir yang utuh atau irisan dicampur dalam larutan ekstraksi (contoh air murni atau alkohol yang diencerkan) selama beberapa kali. Setelah terpisah dari larutan, ekstrak umumnya terkonsentrasi dan langsung digunakan atau dapat juga dibuat dalam bentuk bubuk. Ekstrak, khususnya *Aged Garlic Extract* (AGE), terutama terdiri atas unsur terlarut di air di dalam bawang putih dan sejumlah kecil komponen terlarut dalam minyak. Ekstrak dicirikan dengan senyawa yang terdiri dari sulfur yang larut dalam air termasuk SAC dan SAMC. Selama diproses AGE yang berbau khas dan menyengat serta senyawa iritatif di dalamnya berubah secara alamiah ke dalam senyawa sulfur yang aman dan stabil<sup>6,65</sup>.

### 2.3.6. Farmakokinetik/Bioavailabilitas

Asupan *A.sativum* secara oral seringkali efektif untuk memperoleh efek klinik yang diinginkan. Studi absorpsi pada tikus putih, mencit dan anjing mengindikasikan bioavailabilitas komponen yang dimonitor mendekati 100 %. SAC yang merupakan salah satu senyawa organosulfur di dalam umbi ini meningkat konsentrasinya selama proses ekstraksi / *aging*. Bioavailabilitas SAC pada mencit 103 %, pada tikus putih 98,2 % dan anjing 87,2 %. Distribusi SAC adalah ke plasma, hepar dan ginjal<sup>65,69</sup>.

Senyawa organosulfur terlarut dalam minyak pada *A.sativum*, seperti *allicin*, *sulfida*, *alliin*, *ajoene* dan *vinylidithiine* tidak ditemukan di dalam darah maupun urin sekalipun dikonsumsi dalam jumlah banyak<sup>65,70</sup>. Tetapi studi farmakokinetik zat-zat tersebut pada tikus putih menunjukkan variasi waktu terhadap konsentrasi puncak dalam darah, dari 10 menit sampai 120 menit untuk zat yang berbeda<sup>69</sup>.

DADS merupakan metabolit *Allicin*. Konsentrasi maksimum DADS yang diradiolabel dalam hepar mencit terjadi 90 menit setelah pemberian intraperitoneal. Seperti juga *Allicin*, DADS tidak terdeteksi di dalam darah manusia atau urin pada 1 sampai 24 jam setelah memakai 25 gram *A.sativum* mentah<sup>65</sup>.

Secara keseluruhan, prinsip-prinsip kerja unsur aktif dalam *A.sativum* belum diketahui sepenuhnya<sup>70</sup>. Diasumsikan bahwa bioavailabilitas / farmakokinetik senyawa-senyawa yang terdiri dari sulfur ini akan memainkan peran penting dalam penentuan respons biologik berbagai preparat tanaman obat ini.

### 2.3.7. Efek Farmakologi

*A.sativum* pertama kali dikenal dalam sejarah sekitar 6.000 tahun lalu, bukan dalam bentuk verbal melainkan visual. Rakyat Cina juga telah menggunakannya paling tidak selama 3.000 tahun. *Codex Ebers*, catatan medis bangsa Mesir sekitar 1550 SM, menyebutkan *A.sativum* sebagai obat yang efektif untuk berbagai penyakit ringan, termasuk hipertensi, sakit kepala, digigit serangga, penyakit cacing dan tumor<sup>4</sup>. *Hippocrates*, *Arristotle* dan *Pliny* juga menyebutkan sejumlah penggunaan tanaman obat ini sebagai terapeutika. Aktivitas antibiotiknya dicatat oleh *Pasteur* dalam tahun 1858. Sedangkan *A.Schweitzer* di Afrika telah menggunakan umbi ini untuk mengobati disentri amuba serta sebagai antiseptik dalam mencegah gangren selama perang dunia kedua<sup>64</sup>.

Sampai saat ini sudah banyak sekali penelitian dilakukan untuk mengetahui efektifitas *A.sativum* dan terbukti tanaman ini mempunyai efek yang sangat luas. Pemanfaatan secara klinik yang paling penting antara lain adalah aktivitasnya sebagai :

#### Antibakteri

Sejumlah studi investigasi melaporkan berbagai aktivitas ekstrak *A.sativum* melawan beberapa bakteri strain berbeda. Secara *in vitro* *A.sativum* memiliki aktivitas melawan bakteri gram positif dan gram negatif, dan pada umumnya bakteri aerob lebih peka dibanding bakteri anaerob<sup>5,6,71</sup>. Aktivitas potensial *in vivo* ekstrak *A.sativum* sebagai antibiotik juga diperlihatkan melawan strain bakteri yang resisten

terhadap obat, misalnya *Staphylococcus aureus*, *E. Coli*<sup>6,70,72</sup>, *Helicobacter pylori*<sup>70,71</sup>, *Proteus sp.*, *Pseudomonas* dan *Klebsiella*<sup>5,72</sup>. Jus *A.sativum* maupun *allicin* menghambat pertumbuhan *Streptococcus*, *Bacillus*, *Brucella* dan *Vibrio sp*<sup>64</sup>.

### **Antifungi**

*A.sativum* menunjukkan aktivitas antifungi yang signifikan dalam beberapa studi *in vitro* dan *in vivo*. Dari perspektif klinik, penghambatan terhadap *Candida albicans* paling signifikan baik pada studi *in vitro* maupun pada hewan coba<sup>64,71</sup> dan terbukti lebih poten dibanding nystatin, gentian violet dan agen antifungi lain. Aktivitas antifungi *A.sativum* juga diperlihatkan melawan *Histoplasma capsulatum*, *Torulopsis*, *Trichospora* dan *Dermatophyta sp*<sup>71</sup>. dan *Cryptococcus neoformans*<sup>72</sup>, sementara bentuk ekstrak sangat ampuh melawan *Aspergillus niger*, *A.flavus* dan *A.Fumigatus*<sup>73</sup>.

### **Antiparasitik**

Ekstrak *A.sativum* menunjukkan memiliki aktivitas antiparasit melawan parasit intestinal umum, termasuk *Ascaris lumbricoides*, *Tripanosoma*, *Entamoeba hystolitica*, *Giardia lamblia* dan cacing tambang<sup>64,71,72</sup>.

### **Antivirus**

Efek antivirus *A.sativum* diperlihatkan melalui perlingkungannya pada mencit yang terinfeksi virus influenza yang diinokulasi secara intranasal dan melalui peningkatan produksi antibodi netral saat diberikan vaksin influenza<sup>64</sup>. Efek “virus-killing” *in vitro* preparat mentah, *allicin* dan komponen sulfur yang lain dari *A.sativum* terbukti melawan *Herpes simplex* tipe 1 dan 2, virus *Parainfluenza*

tipe 3, virus Vaccinia, virus *Vesicular stomatitis* dan *Human rhinovirus tipe 2*<sup>64,71,72</sup>.

Urutan aktivitas antivirus tanaman ini adalah *ajoene* > *allicin* > *allyl methylthiosulfinate* > *methyl allyl thiosulfinate*.

### **Efek kardiovaskuler dan anti hiperkolesterol**

*A. sativum* muncul sebagai faktor protektif yang penting untuk mengurangi risiko kematian dini akibat serangan jantung dan stroke melalui kemampuannya menurunkan kadar kolesterol dan tekanan darah. Selain itu preparat ini juga dapat menghambat agregasi platelet, memiliki efek fibrinolitik dan pencegahan oksidasi LDL<sup>64,74</sup>. Sediaan segar, sari, ekstrak maupun minyak atsiri *A.sativum* semuanya dapat menurunkan kolesterol dan lemak plasma, metabolisme lemak dan aterogenesis secara *in vitro* dan *in vivo* dengan berbagai cara pemberian<sup>75</sup>.

Mekanisme aktivitas anti hiperkolesterolemia dan anti hiperlipidemia dari umbi ini menunjukkan terlibatnya penghambatan dari *hepatic-hydroxy methylglutaryl-CoA* (HMG-CoA) reduktase dan penyusunan kembali dari plasma lipoprotein dan membran sel<sup>61,76</sup>.

### **Antikarsinogenik**

Studi epidemiologik dan eksperimental laboratoris menunjukkan potensi antikarsinogenik *A.sativum* dan senyawa sulfur di dalamnya. Baik senyawa sulfur *allyl* yang larut dalam air maupun dalam minyak efektif dalam menghambat berbagai zat kimia yang menginduksi tumor. Potensi antikarsinogenik herbal ini dapat dipengaruhi oleh komponen diet sehari-hari termasuk asam lemak spesifik, selenium dan vitamin A<sup>77</sup>.

Secara eksperimental *A.sativum* dengan komponen sulfurnya dilaporkan menekan insidens tumor payudara, kolon, kulit, uterus dan kanker esofagus, kandung kencing serta paru melalui mekanisme penghambatan pembentukan senyawa *N-nitroso* (NOC), penekanan dalam bioaktivasi beberapa karsinogen, memperkuat perbaikan DNA, mengurangi proliferasi sel dan menginduksi apoptosis<sup>77,78,79</sup>.

### 2.3.8. Efek terhadap Imunitas Tubuh

*A.sativum* dalam berbagai penelitian memperlihatkan aktivitasnya dalam memperkuat berbagai faktor imun (imunostimulan), seperti aktivitas fagositik makrofag, aktivitas limfosit T, aktivitas sel NK dan membangkitkan respons antibodi.

Hasil uji klinis pada pasien AIDS menggunakan AGE menunjukkan peningkatan aktivitas sel NK secara dramatis dalam 6 minggu setelah pengobatan, dan dalam waktu 12 minggu rasio  $CD4^+/CD8^+$  meningkat secara bermakna. Fraksi protein AGE ternyata juga memperkuat sitotoksitas dan proliferasi limfosit dari darah individu yang mengandung HIV saat distimulasi dengan IL-2<sup>69</sup>.

*A.sativum* dalam suatu studi *in vitro* memperlihatkan potensi terapeutik dalam terapi *inflammatory bowel disease* (IBD) karena ternyata dapat menekan leukosit dan produksi sitokin inflamatori yang berhubungan dengan respons imun seluler Th-1 dalam proses inflamasi<sup>80</sup>, serta mengurangi migrasi netrofil yang melewati sel endotelial *monolayer*<sup>81</sup>.

Efek imunomodulator (imunostimulan) *A.sativum* juga dibuktikan dalam studi menggunakan kultur sel tumor. Penelitian ini menunjukkan bahwa AGE menstimulasi proliferasi sel lien mencit dan pelepasan sitokin. AGE dengan kuat meningkatkan fagositosis makrofag peritoneal dan meningkatkan aktivitas sel NK *in vivo* dan *in vitro*. Setelah 24 jam AGE menggandakan kemampuan sel NK untuk merusak YAC-1 (*cancer cell line*)<sup>82</sup>.

Hasil penelitian yang membandingkan efek *A.sativum* dengan BCG sebagai imunoterapi dalam pengobatan kanker vesika urinaria ternyata memperlihatkan banyak kemiripan dalam hal stimulasi proliferasi limfosit dan fagositosis makrofag, induksi infiltrasi makrofag dan limfosit dalam tumor transplantasi, stimulasi pelepasan IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , penguatan sel NK dan aktivitas sel *killer* pengaktivasi limfokin. Aktivitas ini menggambarkan stimulasi respons imun yang efektif<sup>83</sup>.

Aktivitas farmakologik 4 bentuk preparat *A.sativum*, yakni *raw garlic juice* (RGJ), *heated garlic juice* (HGJ), *dehydrated garlic powder* (DGP) dan AGE, semuanya memperkuat aktivitas sel NK dan sel lien *killer* pada mencit. Tetapi hanya AGE dan HGJ yang menghambat pertumbuhan sel tumor yang diinokulasi. Ini meyakinkan bahwa preparat *A.sativum* tipe berbeda memiliki perangkatan farmakologik yang berbeda pula dan diantara empat preparat tersebut, AGE yang paling efektif dan bermanfaat<sup>79</sup>.

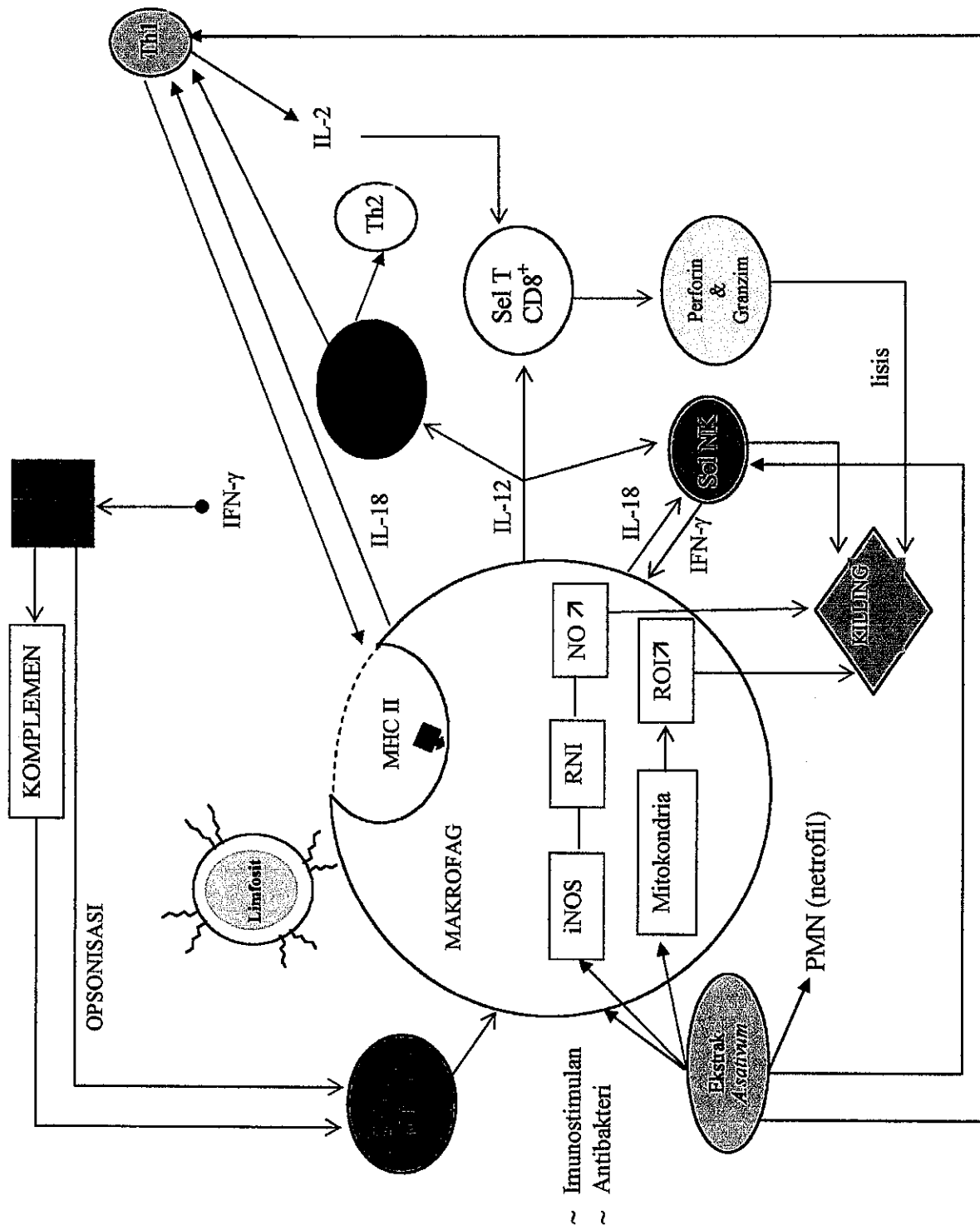


## BAB 3

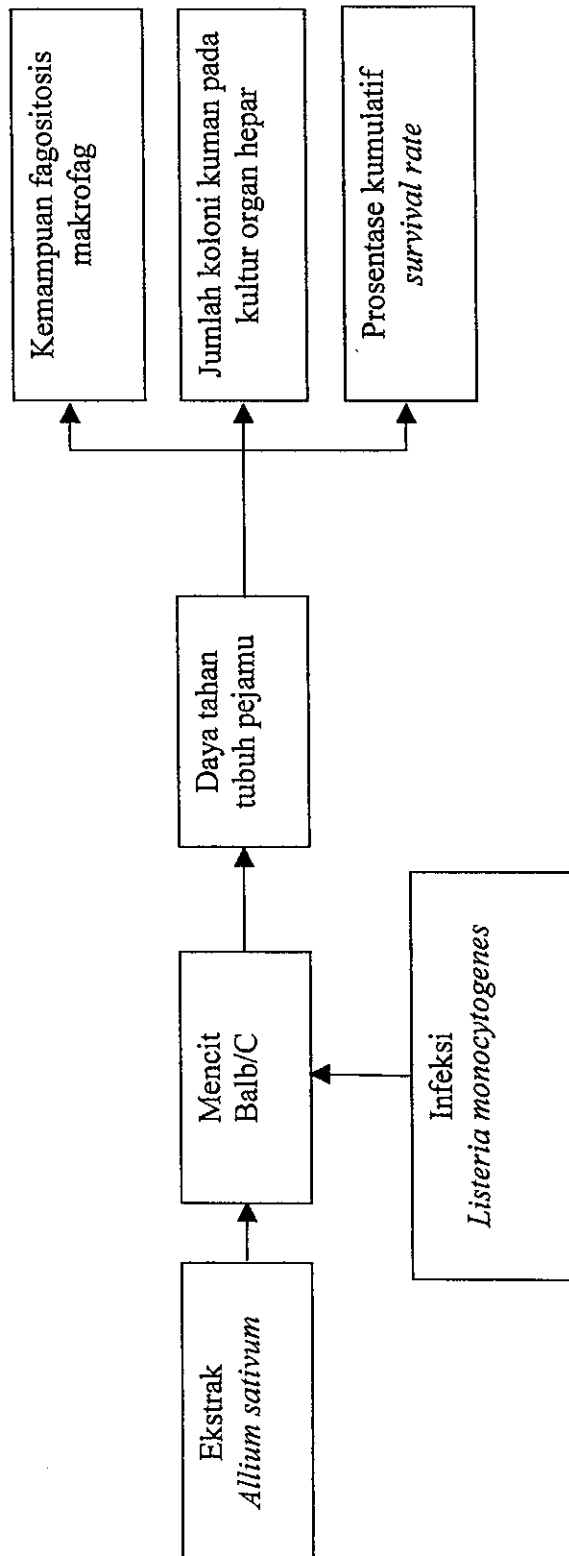
### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

UPT-PUSTAK-UNDIP

#### 3.1. KERANGKA TEORI



### 3. 2. KERANGKA KONSEP



### 3.3. HIPOTESIS

1. Kemampuan fagositosis makrofag kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*.
2. Hitung kuman pada kultur organ hepar kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* lebih sedikit dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*.
3. Prosentase kumulatif angka ketahanan hidup (*survival rate*) pada kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi ekstrak *A.sativum* lebih besar dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*

### 3.4.KETERBATASAN PENELITIAN

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap kadar IL-12 yang disekresi oleh makrofag yang terinfeksi, kadar IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T CD4<sup>+</sup> subset Th1 bersama dengan sel NK dan merupakan aktifator makrofag, produksi ROI dan NO makrofag, aktifitas netrofil serta sel T CD8<sup>+</sup> karena *reagen* yang dibutuhkan untuk maksud tersebut harus didatangkan dari luar negeri, memerlukan biaya besar dan waktu yang lama.

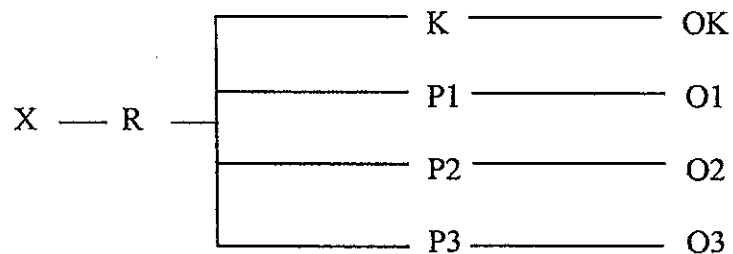
## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik murni dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian<sup>84</sup>.

##### 4.1.1. Penelitian kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah koloni kuman



Keterangan :

X → R : Masa adaptasi 1 minggu

R : Randomisasi

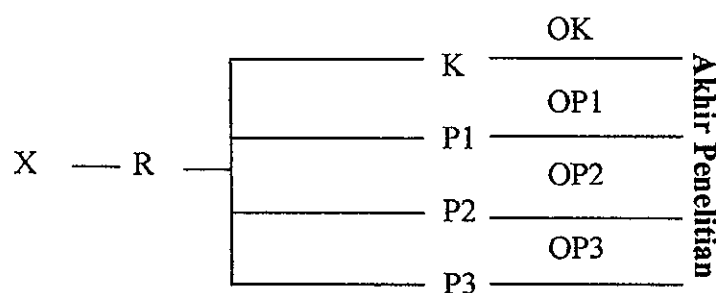
K : Kontrol, sebagai pembanding, mencit hanya diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*.

P1 : Mencit diberi ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*.

P2 : Mencit diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*..

- P3 : Mencit mendapat ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L. monocytogenes*.
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1
- O2 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2
- O3 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

#### 4.1.2. Penelitian ketahanan hidup



Keterangan :

$X \rightarrow R$  : Masa adaptasi 1 minggu.

R : Randomisasi.

K : Kontrol, sebagai pembanding, mencit hanya diinfeksi  $5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*.

P1 : Mencit diberi ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*.

P2 : Mencit diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $5 \times 10^6$  CFU *L. monocytogenes*..

- P3 : Mencit mendapat ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral memakai sonde lambung dan diinfeksi  $5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes*.
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1
- O2 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2
- O3 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

## 4.2. POPULASI DAN SAMPEL

### 4.2.1. Populasi

Populasi target penelitian ini adalah mencit galur Balb/C yang dikembangkan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Sedangkan populasi terjangkau adalah mencit betina galur Balb/C berusia 8-10 minggu<sup>85</sup>. Dipilih mencit galur Balb/C berusia 8-10 minggu, karena beberapa penelitian yang telah dipublikasikan menunjukkan bahwa galur ini sensitif terhadap infeksi *L.monocytogenes* dan beberapa jam setelah infeksi akan menimbulkan respons imunitas seluler melawan bakteri tersebut<sup>86</sup>.

Kuman *L.monocytogenes* dipilih dalam penelitian ini karena patogen ini merupakan organisme yang ideal dan banyak dijadikan model untuk mempelajari respons imun non spesifik maupun spesifik terhadap infeksi bakteri intraseluler<sup>87</sup>.

## **4.2.2. Sampel**

### **4.2.2.1. Cara Pengambilan Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit. Untuk menghindari bias dalam perlakuan maka perlu ditetapkan kriteria inklusi untuk sampel, yaitu<sup>88</sup> :

1. Faktor keturunan mencit, diambil dari populasi mencit yang secara genetis adalah homogen yaitu mencit galur Balb/C.
2. Jenis kelamin, dipilih yang berjenis kelamin betina.
3. Umur, diambil yang berumur 8-10 minggu.
4. Berat badan sebelum perlakuan, memiliki berat 20-30 gram.
5. Penampilan fisik, dipilih mencit yang sehat, lincah dan tidak mempunyai kelainan anatomis yang tampak.

Sedangkan kriteria eksklusi adalah :

1. Mencit bukan galur Balb/C.
2. Jenis kelamin jantan.
3. Umur kurang dari 8 minggu atau lebih dari 10 minggu.
4. Mencit terlihat sakit dan memiliki kelainan anatomis.

Hal-hal lain yang juga harus dikontrol adalah :

- Penempatan kandang, ditempatkan pada ruangan yang sama, dengan ventilasi udara dan cahaya yang memadai.
- Frekuensi dan kualitas pembersihan kandang diusahakan sama untuk semua kelompok percobaan.

- Pemberian makanan dilakukan pada jam-jam yang sama secara *ad libitum* pada semua kelompok percobaan.

Dengan dikontrolnya hal-hal tersebut di atas serta ditetapkan kriteria inklusi dan eksklusi, maka pengambilan sampel secara random atau tidak bukan merupakan masalah. Tetapi untuk menghindari bias karena variasi umur dan berat badan maka pengelompokan sampel tetap dilakukan dengan cara acak dan berat badan mencit ditimbang sebelum perlakuan. Dari penimbangan didapatkan berat badan rata-rata mencit yang digunakan adalah  $27,6 \pm 3,4$  gram. Setelah dianalisis dengan *one sample t test* ternyata tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p=0,492$ ) sehingga memenuhi kriteria inklusi untuk berat badan. Dari uji *Levene* didapatkan nilai  $p=0,121$  sehingga disimpulkan bahwa berat badan sampel adalah homogen.

#### 4.2.2.2. Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel minimal menggunakan rumus besar sampel eksperimental dari *Federer*, yaitu  $(t-1)(r-1) \geq 15$ , dimana  $t$  = jumlah perlakuan dan  $r$  = jumlah ulangan atau sampel perkelompok<sup>89</sup>. Dalam penelitian ini jumlah perlakuan adalah 4, sehingga jumlah sampel perkelompok perlakuan harus lebih dari 5. Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorik sebanyak 24 ekor mencit. Untuk pengamatan ketahanan hidup dengan kelompok perlakuan yang sama (K,P1,P2, & P3), masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor mencit



sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 48 ekor mencit. Jadi jumlah keseluruhan mencit yang dibutuhkan sebanyak 72 ekor.

### 4.3. VARIABEL PENELITIAN

#### 4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak *A.sativum* dengan dosis bervariasi (1 mg/hari, 2 mg/hari dan 4 mg/hari)<sup>84</sup>.

#### 4.3.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kemampuan fagositosis makrofag, pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar dan ketahanan hidup mencit<sup>84</sup>.

- a. Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang dihitung pada 200 sel kali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai indeks fagositik<sup>90</sup>.
- b. Pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar adalah penghitungan jumlah koloni kuman yang dinyatakan dalam CFU/gram jaringan<sup>91</sup>.
- c. Ketahanan hidup mencit adalah panjang waktu (lamanya) mencit bertahan hidup sejak dari awal pengamatan (hari pertama pasca infeksi) sampai akhir periode penelitian (hari ke-21 pasca infeksi) yang dinyatakan dalam prosentase *survival*<sup>92</sup>.

#### 4.3.3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah *L.monocytogenes* sebagai imunogen. Dosis *L.monocytogenes* yang digunakan untuk pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan hitung kuman adalah  $2,5 \times 10^6$  CFU ( $LD_{50} 2,5 \times 10^7$ ), sedangkan untuk pengamatan ketahanan hidup digunakan dosis  $5 \times 10^6$  CFU.

#### 4.4. BAHAN DAN REAGEN PENELITIAN

- Makrofag peritoneal dari mencit betina galur Balb/C berumur 8-10 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM Yogyakarta.
- Organ hepar dari mencit yang tersebut di atas.
- Ekstrak *A. sativum*
- *L.monocytogenes* dalam media HIB, diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang.
- *Free Hank's Balanced Salt Solution* (CMF-HBSS) mengandung  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$ .
- *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640.
- *Latex beads* 50  $\mu$ l (Sigma Cat. L30).
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS).

- *Fetal Bovine Serum* (FBS).
- Larutan Giemsa 20 %.
- Penicillin-Streptomycin.
- Agar darah.
- Alkohol 70 % (v/v).
- NH<sub>4</sub>Cl.
- Glutamin.
- Metanol.
- *Canada Balsam*
- Larutan NaCl fisiologis steril
- Aquadest steril.
- Pakan standar.

#### 4.5. ALAT/INSTRUMEN PENELITIAN

- Semprit 1 ml dan 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge.
- Tabung sentrifus 15 ml dan 50 ml steril.
- Pipet ukur 25 ml dan 50 ml
- Gunting, pinset dan klem.
- Pipet pasteur steril.
- Tabung berlapis silikon.
- Tabung reaksi biasa.
- *Hemocytometer*.
- *Laminar flow hood*.
- Inkubator CO<sub>2</sub>.
- Mikroskop cahaya + kamera foto.
- *Colony counter*.
- *Aluminium foil*, Mortir
- *Vortex Genie 2*
- Cawan petri.
- Timbangan elektronik dan biasa.
- Sonde lambung.
- Tabung reaksi dengan alas datar
- *Microplate 24 well*.
- *Coverslip*.
- Kaca benda.
- *Refrigerated centrifuge*.
- Gelas ukur.
- Pipet ependorf
- Blue tip dan Yellow tip
- Kandang hewan coba.

#### 4.6. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di :

- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Juni sampai Juli 2003.
- Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Juni sampai Juli 2003.
- Balai Laboratorium Kesehatan Semarang pada bulan Juni sampai Juli 2003.

#### 4.7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- Sebanyak 72 ekor mencit betina galur Balb/C berumur 8-10 minggu diadaptasikan selama seminggu di laboratorium dengan cara dikandangkan secara memadai dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*.
- Mencit-mencit tersebut kemudian dipisahkan menjadi 2 kelompok besar, yaitu :
  - Kelompok besar I yang terdiri dari 24 ekor untuk pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah koloni kuman.
  - Kelompok besar II yang terdiri dari 48 ekor untuk pengamatan ketahanan hidup.
- Setiap kelompok diberi pakan standar sama dan dilakukan penimbangan berat badan sebelum perlakuan.

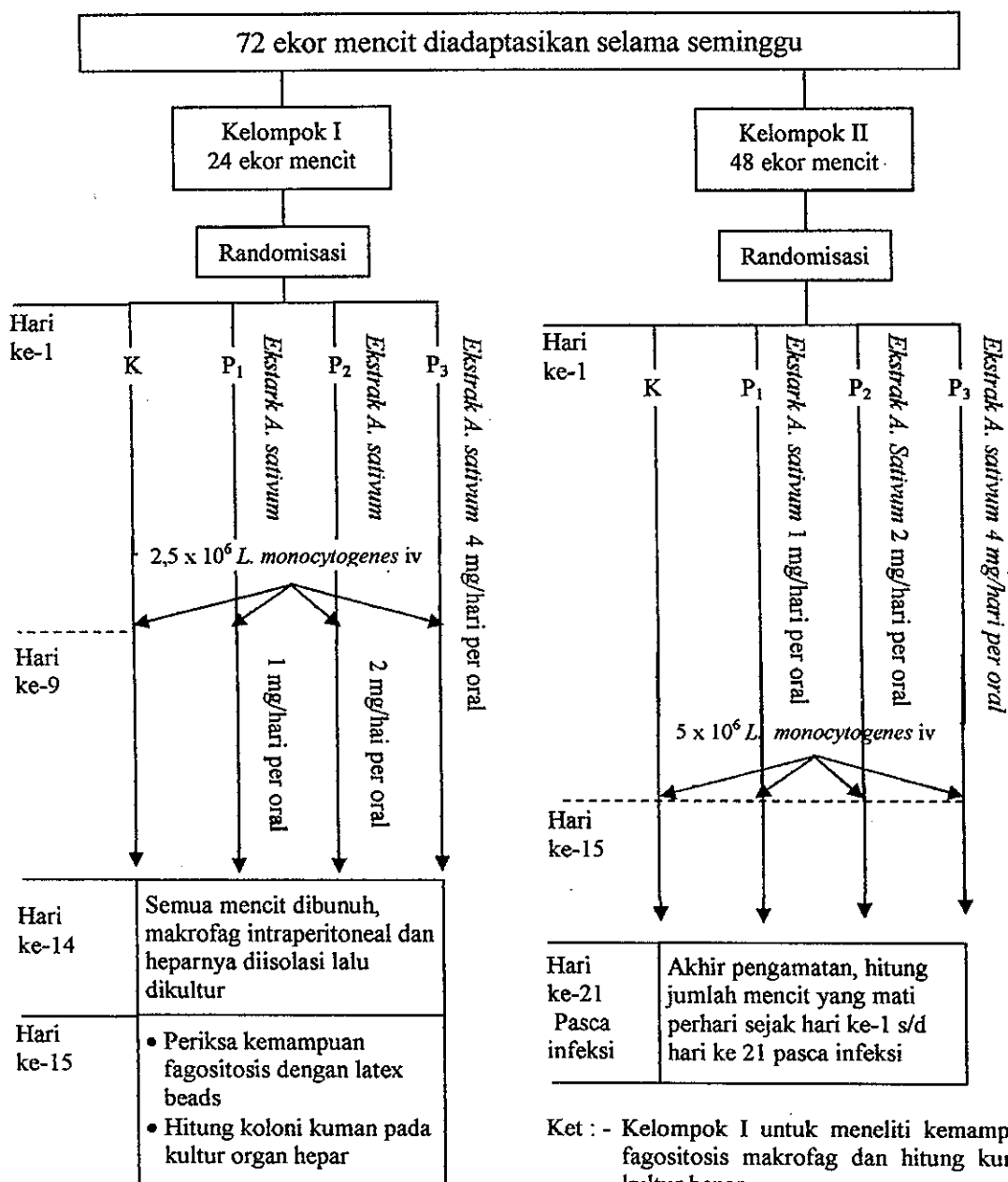
- Kelompok besar I dibagi lagi menjadi 4 kelompok kecil dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit yang ditentukan dengan cara acak sederhana lalu dikandangkan per kelompok.
  - Kelompok kontrol (K) : mencit hanya mendapat diet standar selama 14 hari, pada hari ke-9 diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes* intra vena. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.
  - Kelompok P1 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari per oral memakai sonde lambung selama 14 hari, hari ke-9 diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes* intra vena. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.
  - Kelompok P2 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari per oral memakai sonde lambung selama 14 hari, pada hari ke-9 diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes* intra vena. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.
  - Kelompok P3 : selain mendapat diet standar, mencit diberikan juga ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral memakai sonde lambung selama 14 hari, pada hari ke-9 diinfeksi  $2,5 \times 10^6$  CFU *L.monocytogenes* intra vena dan selanjutnya hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan

pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.

- Kelompok besar II dibagi lagi menjadi 4 kelompok kecil dimana masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor mencit yang ditentukan dengan cara acak sederhana lalu dikandangkan per kelompok. Setiap kelompok kecil ini kemudian diberi perlakuan sebagai berikut :
  - Kelompok kontrol (K) : mencit hanya mendapat diet standar, pada hari ke-15 diinfeksi dengan *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  CFU intra vena.
  - Kelompok P1 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari per oral memakai sonde lambung kemudian pada hari ke-15 diinfeksi *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  CFU intra vena.
  - Kelompok P2 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari per oral memakai sonde lambung kemudian pada hari ke-15 diinfeksi *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  CFU intra vena.
  - Kelompok P3 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral memakai sonde lambung kemudian pada hari ke-15 diinfeksi *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  CFU intra vena.

Pengamatan ketahanan hidup dilakukan hari pertama sampai hari ke-21 pasca infeksi lalu dihitung prosentase kumulatifnya.

#### 4.8. ALUR KERJA PENELITIAN



Ket : - Kelompok I untuk meneliti kemampuan fagositosis makrofag dan hitung kuman kultur hepar.  
 - Kelompok II untuk meneliti ketahanan hidup mencit.

## 4.9. PROSEDUR PEMERIKSAAN

### 4.9.1. Prosedur Isolasi Makrofag Mencit<sup>93</sup>

- Mencit dibunuh dengan dislokasi servikal, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disiram alkohol 70 %.
- Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas, dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
- Injeksikan 2-3 ml CMF-HBSS dalam rongga peritoneum.
- Dengan ujung jarum menghadap ke atas/ventral, peritoneum dipijat pelan. Injeksikan 7-8 ml CMF-HBSS. Sedot kembali cairan dalam rongga peritoneum sampai habis, bila masih ada sisa cairan dihisap menggunakan pipet Pasteur steril. Masukkan cairan ke dalam tabung berlapis silikon.
- Cairan disentrifus 800 xg pada suhu 20° C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut 2 kali menggunakan CMF-HBSS.
- Makrofag dipurifikasi dengan cara menempatkan sel-sel peritoneal pada permukaan plastik selama 2-4 jam pada suhu 37° C, lalu tuang CMF-HBSS pelan-pelan untuk menghindari sedimen pellet sel adheren ikut tertuang. Sel yang digunakan adalah sel yang adheren.



- Tambahkan medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penisilin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), glutamine (1mM) dan 10 % FBS.
- Hitung sel-sel dengan Hemacytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisiskan sel darah merah.
- Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml selama 48 jam dalam CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C

#### 4.9.2. Pemeriksaan Fagositosis Makrofag dengan Latex Beads<sup>94</sup>

- Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran diisi 200 µl ( $5 \times 10^5$  sel), inkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit.
- Tambahkan medium komplit 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
- Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian tambahkan medium komplit 1 ml/ sumuran, inkubasikan sampai 24 jam.
- Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2 kali dengan RPMI.
- Latex beads diresuspensikan sehingga mendapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml.
- Tambahkan suspensi latex 200 µl/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub>.
- Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit.
- Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan metanol absolut.

- Setelah kering, *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.
- Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
- Setelah kering dilekatkan pada kaca benda.
- Hitung kemampuan fagositosis makrofag setiap preparat dengan mikroskop cahaya, dengan pengulangan penghitungan 3 kali.

#### 4.9.3. Pemeriksaan Koloni Kuman pada Kultur Organ Hepar<sup>91</sup>

- Ambil organ hepar dari setiap individu mencit dan lakukan penimbangan.
- Hancurkan jaringan hepar dengan mortir setelah menambahkan 1ml NaCl fisiologis steril di dalam tabung.
- Siapkan 6 buah tabung untuk pengenceran bertingkat yang masing-masing berisi 4,5 ml NaCl fisiologis steril.
- Masukkan 0,5 ml larutan dari mortir ke tabung I dan dilakukan homogenisasi.
- Ambil 0,5 ml larutan dari tabung I kemudian masukkan ke tabung II dan seterusnya dilakukan prosedur yang sama sampai tabung VI sehingga telah dilakukan pengenceran 1 : 10 untuk tiap tingkat pengenceran. Pada tabung terakhir diambil 0,5 ml untuk dibuang. Semua proses ini dilakukan dalam *laminar flow*.
- Inokulasikan 0,1 ml sampel dari masing-masing tabung pengenceran pada *Blood Agar*, kemudian diinkubasikan dalam inkubator 37° C selama 24 jam.

- Hitung jumlah koloni pada masing-masing *plate* pengenceran yang berisi 30-300 CFU.
- Hitung CFU/gram jaringan dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah CFU} \times \text{Pengenceran} \times 10 \text{ (karena inokulasinya hanya 0,1 ml per plate)}}{\text{Berat jaringan}}$$

#### 4.9.4. Pemeriksaan Ketahanan Hidup Mencit

Mengamati jumlah mencit yang mati (Kelompok II) setiap hari per kelompok perlakuan selama 21 hari pengamatan pasca infeksi. Pada akhir pengamatan dihitung *survival rate* yang dinyatakan dalam prosentase kumulatif.

### IV.10. ANALISA DATA

Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dahulu diedit, dikoding, di-*entry* dalam file komputer dan di-*cleaning*. Setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif dan analitik.

Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (mean dan median) dan sebaran (SD/persentil) kemampuan fagositosis makrofag (indeks fagositik), hitung koloni kuman pada kultur organ hepar serta jumlah mencit yang mati selama observasi menurut kelompok perlakuan. Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel silang dan grafik *boxplot* menurut kelompok perlakuan untuk variabel indeks fagositik makrofag dan hitung koloni kuman.

Selanjutnya dalam analisis analitik, dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* (karena jumlah sampelnya sedikit) terhadap indeks fagositik, hitung koloni kuman dan jumlah mencit yang mati selama observasi. Ternyata

didapatkan distribusi data yang tidak normal terhadap indeks fagositik makrofag dan hitung kuman kultur organ hepar sehingga uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan perbedaan antar kelompok dilakukan uji beda dengan *Mann-Whitney U*. Untuk analisis jumlah mencit yang mati dilakukan analisis *survival* dengan membuat grafik *survival rate* dan uji bedanya dengan *Logrank test*. Analisis statistik dibantu dengan program SPSS 10.0 for windows. Nilai signifikansi dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0,05^{95,96}$ .

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. HASIL PENELITIAN

##### 5.1.1. Kemampuan Fagositosis Makrofag

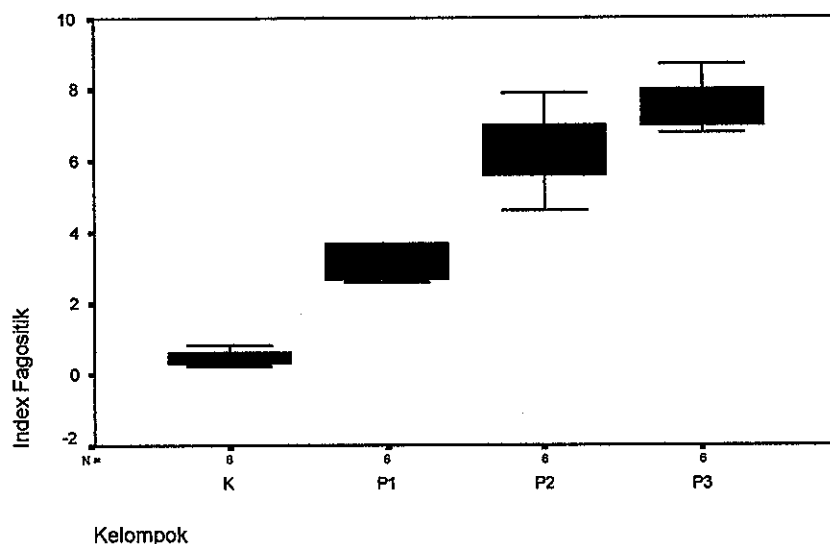
Kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositik. Data hasil penelitian tersaji pada tabel 2 dan hasil analisis deskriptifnya dapat dilihat pada tabel 3 dan tergambar pada grafik *Boxplot* (gambar 6) di bawah ini.

**Tabel 2.** Hasil Penelitian Kemampuan Fagositosis Makrofag (Indeks Fagositik)

Kelompok N	K	P1	P2	P3
1	0,5	3,7	7,0	7,0
2	0,8	2,6	7,9	7,0
3	0,5	3,5	6,6	8,7
4	0,2	3,7	4,6	7,7
5	0,6	2,7	5,6	8,0
6	0,3	3,5	5,6	6,8
Total	2,9	19,7	37,3	45,2

**Tabel 3.** Hasil Analisis Indeks Fagositik Makrofag

Kelompok Percobaan	N	Rerata	Standar Deviasi	Standar Error	Interval Kepercayaan 95 %		Minimum	Maksimum
					Batas Atas	Batas Bawah		
K	6	0,5	0,2	8,7	0,7	0,3	0,2	0,8
P1	6	3,3	0,5	0,2	3,8	2,6	2,6	3,7
P2	6	6,2	1,2	0,5	7,5	5,0	4,6	7,9
P3	6	7,5	0,7	0,3	8,3	6,8	6,8	8,7



**Gambar 6.** Grafik *Boxplot* Indeks Fagositik Makrofag

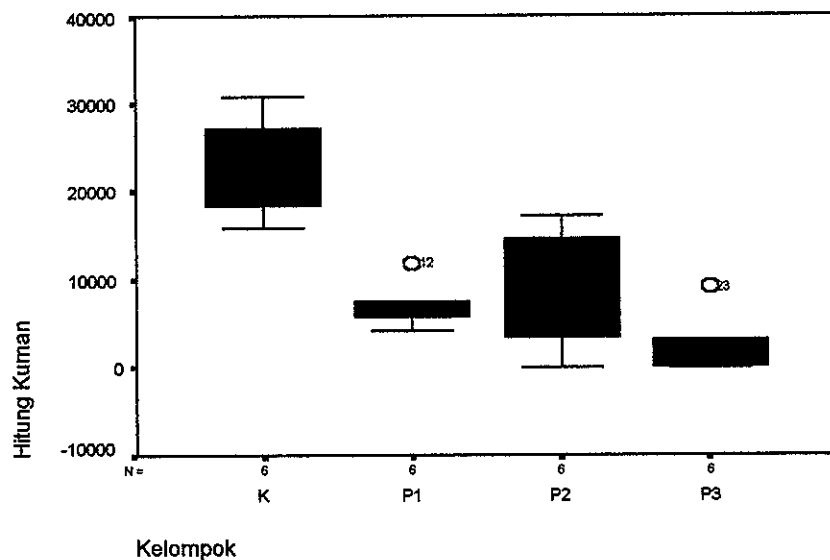
Dari tabel dan grafik tersebut di atas terlihat bahwa rata-rata kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositik paling tinggi terdapat pada kelompok percobaan P3, yaitu kelompok mencit yang diberikan ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral, mencapai  $7,5 \pm 0,7$ . Sedangkan nilai rata-rata yang paling rendah didapatkan pada kelompok kontrol (K), yaitu kelompok mencit yang tidak diberikan ekstrak *A.sativum* ( $0,5 \pm 0,2$ ).

Setelah dilakukan analisis statistik ternyata distribusi data indeks fagositik adalah tidak normal sehingga uji hipotesis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan diperoleh hasil terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,0001$ ) pada indeks fagositik makrofag antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan selanjutnya dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney U* seperti tersaji pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji *Mann-Whitney U* Indeks Fagositik Makrofag

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,002*	0,002*	0,002*
P1	0,002*		0,002*	0,002*
P2	0,002*	0,002*		0,065
P3	0,002*	0,002*	0,065	

Dari tabel tersebut terlihat dengan jelas bahwa semua kelompok perlakuan baik P1 (kelompok mencit yang diberikan ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari per oral), P2 (kelompok mencit yang diberikan ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari per oral), maupun P3 (kelompok mencit yang diberikan ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral) apabila dibandingkan dengan kontrol (kelompok mencit yang tidak diberikan ekstrak *A.sativum*) maka indeks fagositiknya didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p=0,002$ ). Pada grafik *boxplot* indeks fagositik makrofag (gambar 6) juga terlihat bahwa, ada perbedaan median indeks fagositik makrofag antara kelompok (K) dengan perlakuan (P1,P2 dan P3). Dan semakin tinggi dosis (P3) semakin tinggi kemampuan fagositosis makrofagnya. Hal ini menunjukkan ada hubungan yang erat antara dosis ekstrak *A.sativum* dengan aktivitas fagositosis makrofag, meskipun dari uji *Mann-Whitney U* tampak bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara pemberian ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari (P2) dengan 4 mg/hari (P3). Melihat hasil ini maka dapat disimpulkan bahwa kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/C yang mendapat ekstrak *A.sativum* dengan dosis bervariasi lebih tinggi secara bermakna dibandingkan



**Gambar 7.** Grafik *Boxplot* Hitung Kuman Kultur Organ Hepar

Dari tabel dan grafik *Boxplot* tersebut tampak bahwa rata-rata hitung kuman kultur organ hepar yang paling sedikit didapatkan pada kelompok yang diberi ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari ( $2.434,8 \pm 3.458,4$  CFU/gram). Kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak *A.sativum* ternyata memiliki rerata hitung kuman yang paling banyak, mencapai  $23.783,3 \pm 5.682,8$  CFU/gram diikuti oleh kelompok P1 yang diberi ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari yaitu sebanyak  $13.335 \pm 3.951,6$  CFU/gram, kemudian kelompok P2 yang diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari sebanyak  $7.775 \pm 6.764,2$  CFU/gram.

Setelah dilakukan analisis statistik ternyata distribusi data hitung kuman kultur organ hepar tidak normal, jadi uji hipotesis untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok percobaan dilakukan dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Dari uji tersebut didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ( $p=0,003$ ) pada hitung kuman kultur organ hepar antar kelompok percobaan yang



dengan mencit yang tidak diberikan ekstrak tersebut. Dengan demikian hipotesis kerja pertama terbukti.

### 5.1.2. Hitung Kuman Kultur Organ Hepar

Hitung kuman pada penelitian ini dinyatakan dalam CFU/gram jaringan hepar. Data hasil penelitian tersaji pada tabel 5, hasil analisis deskriptifnya seperti terlihat pada tabel 6 dan terlukis pada grafik *Boxplot* (gambar 7) di bawah ini.

**Tabel 5.** Hasil Penelitian Hitung Kuman Kultur Organ Hepar

Kelompok N	K	P1	P2	P3
1	26.700	5.600	0	648
2	18.400	7.360	14.500	3.070
3	15.800	6.650	3.910	1.700
4	30.800	41.500	3.380	0
5	23.900	7.220	7.660	9.090
6	27.100	11.800	17.200	101
Total	142.700	80.130	46.650	14.609

**Tabel 6.** Hasil Analisis Hitung Kuman Kultur Organ Hepar (CFU/gram)

Kelompok Percobaan	N	Rerata	Standar Deviasi	Standar Error	Interval Kepercayaan 95 %		Minimum	Maximum
					Batas bawah	Batas atas		
K	6	23.783,3	5.682,8	2.320	17.819,7	29.747	15.800	30.800
P1	6	13.355	13.951,6	5.695,7	-1.286,3	27.996,3	5.600	41.500
P2	6	7.775	6.764,2	2.761,5	676,4	14.873,6	0	17.200
P3	6	2.434,8	3.458,4	1.411,9	-1.194,5	6.064,2	0	9.090

terdiri dari 4 kelompok. Untuk melihat besarnya perbedaan yang nyata antar kelompok percobaan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Hasil analisisnya tersaji dalam tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil Uji *Mann Whitney U* Hitung Kuman Kultur Organ Hepar

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,065	<b>0,004*</b>	<b>0,002*</b>
P1	0,065		0,589	<b>0,026*</b>
P2	<b>0,004*</b>	0,589		0,132
P3	<b>0,002*</b>	<b>0,026*</b>	0,132	

Apabila hitung kuman kultur organ hepar kelompok P1 dibandingkan dengan kelompok kontrol maka tidak diperoleh perbedaan yang signifikan ( $p=0,065$ ), sedangkan perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok P2 bila dibandingkan dengan kontrol (K) dengan nilai  $p=0,004$ , demikian juga pada kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,002$ ). Perbedaan yang bermakna juga didapatkan pada kelompok P1 bila dibandingkan dengan P3 ( $p=0,026$ ) tetapi antara kelompok P2 dengan P3 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,132$ ). Pada grafik *boxplot* hitung kuman kultur organ hepar (gambar 7) terlihat bahwa hitung kuman semakin menurun jumlahnya sejalan dengan penambahan dosis ekstrak *A.sativum*. Hal ini menunjukkan ada hubungan yang erat antara dosis ekstrak *A.sativum* dengan pertumbuhan *L.monocytogenes* pada organ hepar, meskipun dari uji *Mann-Whitney U* terlihat bahwa dosis *A.sativum* 1 mg/hari (P1) belum menimbulkan perbedaan yang signifikan

dibanding kelompok kontrol. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa hitung kuman kultur organ hepar pada mencit Balb/C yang mendapat ekstrak *A.sativum* dengan dosis bervariasi (2 mg/hari dan 4 mg/hari) menurun secara bermakna dibandingkan dengan mencit yang tidak diberikan ekstrak tersebut. Hasil ini membuktikan hipotesis kerja yang kedua.

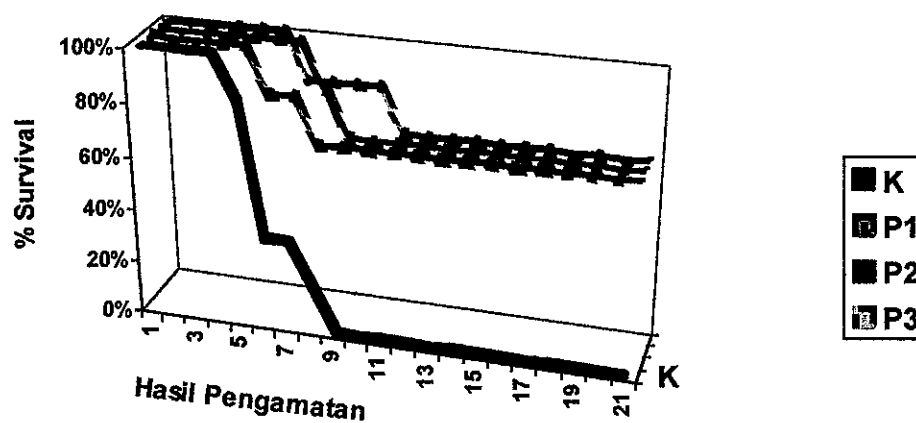
#### **5.1.3. Ketahanan hidup (*survival*)**

Survival diamati dari kematian mencit yang mati setiap hari dalam setiap kelompok percobaan, kemudian dihitung prosentase *survival* (yang bertahan hidup) sejak dari hari pertama sampai hari ke-21 pasca infeksi dengan *L.monocytogenes*. Hasil pengamatan *survival* seperti yang terlihat pada tabel 8 selanjutnya hasil analisis prosentase kumulatif *survival* tersaji dalam tabel 9 dan gambar 8 di bawah ini.



**Tabel 9.** Prosentase kumulatif *survival*

Kelompok	% <i>Survival</i>
K	25 %
P1	66,7 %
P2	75 %
P3	75 %

**Gambar 8.** Perbandingan kurva *survival*

Selanjutnya perbedaan pada keempat kelompok percobaan diuji dengan *Logrank test* seperti terlihat pada tabel 10.

**Tabel 10.** Hasil uji *Logrank survival*

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,0542	<b>0,0125*</b>	<b>0,0208*</b>
P1	0,0542		0,6708	0,6849
P2	<b>0,0125*</b>	0,6708		0,9671
P3	<b>0,0208*</b>	0,6849	0,9671	

Berdasarkan grafik prosentase kumulatif *survival* (gambar 8) dan uji beda *Logrank* antar kelompok percobaan, tampak bahwa *survival* kelompok perlakuan dengan ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari (P1), 2 mg/hari (P2) dan 4 mg/hari (P3) menunjukkan prosentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*. Apabila kelompok P1 dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) maka didapatkan perbedaan yang tidak bermakna dengan nilai  $p=0,0542$ , sementara P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) benar-benar berbeda secara bermakna dimana nilai  $p=0,0125$  demikian pula antara P3 dengan kelompok kontrol (K) dengan nilai signifikansi  $p=0,0208$ . Dari ketiga kelompok perlakuan tersebut terlihat bahwa *survival rate* yang paling tinggi terdapat pada kelompok P2 dan P3 (75 %) diikuti dengan kelompok P1 (66,7 %), sedangkan kelompok kontrol (K) sebesar 25 %. Dengan demikian hipotesis kerja ketiga yang menyatakan bahwa prosentase kumulatif *survival rate* pada kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi berbagai dosis ekstrak *A.sativum* lebih besar dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak tersebut terbukti. Tetapi dari hasil ini terlihat bahwa semakin tinggi dosis *A.sativum survival ratenya* tidak semakin tinggi.

## 5.2. PEMBAHASAN

### 5.2.1. Kemampuan Fagositosis Makrofag

Kuman *L.monocytogenes* merupakan patogen intraseluler fakultatif yang mampu bertahan dan mengadakan replikasi di dalam makrofag sekaligus

menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Respons imun protektif utama melawan bakteri ini adalah imunitas seluler. Imunitas seluler terdiri atas dua tipe reaksi *killing* terhadap mikroba berupa hasil aktivasi makrofag oleh sitokin berasal dari sel T dan lisis sel terinfeksi oleh sel T CD8<sup>+</sup>. Respons imun non-spesifik paling awal melawan imunogen ini terutama diperantarai oleh fagosit profesional makrofag tanpa peran sel limfosit. Reaksi selanjutnya tergantung pada kemampuan pejamu untuk meningkatkan respons imun seluler spesifik terutama sel T CD4<sup>+</sup> subset Th1 yang memproduksi IFN- $\gamma$  untuk mengaktivasi makrofag sehingga memperkuat mekanisme bakterisidalnya<sup>9,13,14</sup>. Berdasarkan teori tersebut penulis ingin mengetahui apakah *A.sativum* dapat meningkatkan daya tahan tubuh atau berfungsi sebagai imunostimulan pada infeksi oleh bakteri intraseluler dan dipilih imunogen *L.monocytogenes* sebagai model yang diinfeksi kepada mencit Balb/C secara *in vivo* kemudian dilihat respons imunitasnya.

Salah satu variabel respons imun seluler yang dinilai dalam penelitian ini adalah aktivitas makrofag sebagai fagosit profesional. Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efektor hanya setelah sel itu diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. Proses fagositosis dimulai dengan kemotaksis diikuti dengan adhesi, penelanan *ingesti*, pencernaan sampai pembunuhan *killing*. Makrofag yang terinfeksi *L.monocytogenes* akan berespons dengan memproduksi IL-12, yang kemudian menginduksi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel NK dan sel T CD4<sup>+</sup>. IFN- $\gamma$  bekerja secara sinergis dengan produk bakteri untuk memaksimalkan fungsi efektor makrofag teraktivasi dan sekresi sitokin inflamasi mereka.

Pada gilirannya IFN- $\gamma$  menginduksi produksi IL-12 di dalam makrofag sehingga memperkuat mekanisme bakterisidal makrofag untuk membatasi replikasi *L.monocytogenes* di dalam sel ini<sup>47,53</sup>.

Pemberian ekstrak *A.sativum* pada mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* ternyata mampu mengaktivasi makrofag ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag dibanding pada mencit kontrol. Dalam penelitian ini kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositik meningkat secara signifikan ( $p < 0,0001$ ) pada semua kelompok perlakuan dengan ekstrak *A.sativum* (1 mg/hari, 2 mg/hari dan 4 mg/hari). Terlihat ada perbedaan median indeks fagositik makrofag antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan (P1, P2 dan P3), dan semakin tinggi dosis (P3) semakin tinggi kemampuan fagositosis makrofagnya. Diasumsikan bila kemampuan fagositosis makrofag meningkat maka produksi sitokin-sitokin yang mengaktivasi makrofag juga meningkat. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kyo E, et al (2001) yang menyelidiki efek imunomodulasi dan efek anti tumor ekstrak *A.sativum* pada medium kultur sel tumor. Ternyata ekstrak *A.sativum* dapat meningkatkan proliferasi sel lien, secara signifikan meningkatkan sekresi IL-12, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , memperkuat aktivitas sel NK dan dengan nyata menginduksi aktivitas fagositik makrofag peritoneal<sup>82</sup>. Dalam penelitian ini terbukti bahwa kemampuan fagositosis makrofag kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi berbagai dosis ekstrak *A.sativum* lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*.





### 5.2.2. Hitung Kuman Kultur Organ Hepar

*L.monocytogenes* yang berhasil menghindari dari perangkap vakuola makrofag akan masuk ke sitoplasma dan bereplikasi di dalamnya. Sel yang terinfeksi di dalam sitoplasmanya akan memproses protein listerial seperti *hemolisin LLO* di dalam peptida dan mempresentasikannya kepada molekul MHC kelas I pada permukaan sel. Sel T  $CD8^+$  kemudian mengenali sel yang terinfeksi ini dan melisiskan mereka. Ini merupakan jalur utama untuk destruksi hepatosit terinfeksi pada mencit<sup>10,13</sup>. Jadi baik sel T  $CD4^+$  maupun sel T  $CD8^+$  diaktivasi secara spesifik selama terjadinya infeksi. Untuk melihat hasil akhir interaksi respons imun non-spesifik dan respons imun sel T baik subset T  $CD4^+$  maupun sel T  $CD8^+$  dilakukan pemeriksaan hitung kuman pada kultur organ hepar.

Infeksi pada mencit percobaan dengan *L.monocytogenes* yang diberikan secara intravena menunjukkan bahwa bakteri dengan cepat keluar dari aliran darah menuju ke organ hepar dan lien. Sebagian besar bakteri terakumulasi di dalam hepar karena ditangkap oleh sel *Kupffer* yang kemudian membunuhnya sehingga terjadi penurunan jumlah populasi bakteri yang dapat hidup di dalam hepar selama 6 jam pertama pasca infeksi. Sel *Kupffer* dipercaya menginisiasi perkembangan imunitas antilisterial melalui induksi proliferasi limfosit T dan sekresi sitokin<sup>12,15</sup>. Dalam penelitian ini diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan hasil hitung kuman kultur organ hepar yang signifikan antara kelompok P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai  $p=0,004$  dan  $p=0,002$  berturut-turut. Hitung kuman yang paling sedikit terdapat pada kelompok P3 yang diberi ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari per oral. Namun demikian masih perlu

dipertimbangkan adanya kemungkinan lain yang mengontrol pertumbuhan bakteri dalam penelitian ini. Secara *in vivo* kuman ini mampu masuk ke sel-sel pejamu selain makrofag, dan sel hepatosit merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhannya. Untuk dapat dihancurkan oleh makrofag yang teraktivasi kuman ini perlu dikeluarkan dulu dari sel hepatosit. Pengeluaran dari hepatosit dilakukan dengan menghancurkan sel-sel ini oleh leukosit yang berkumpul di sekitar tempat terinfeksi dan melakukan degranulasi ekstraseluler. Eksperimen pada mencit menunjukkan bahwa aktivasi netrofil PMN di dalam hepatosit adekuat untuk mengeliminasi *L.monocytogenes* dari hepar, mungkin berkoordinasi dengan respons imun alamiah lokal. Selain netrofil, sel-sel lain yang juga berperan terhadap penghancuran sel-sel hepatosit diantaranya adalah monosit, sel NK dan sel T<sup>15,16</sup>. Dalam penelitian ini terbukti bahwa hitung koloni kuman pada kultur hepar kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi berbagai dosis ekstrak *A.sativum* lebih sedikit dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*.

### 5.2.3. Ketahanan hidup (*survival*)

Sesuai dengan hasil penelitian yang diharapkan, disini terlihat bahwa ekstrak *A.sativum* bersifat sebagai imunostimulator yang dapat meningkatkan respons imun terutama imunitas seluler dalam melawan infeksi bakteri intraseluler. Dari penelitian ini terlihat bahwa kelompok mencit yang diberikan ekstrak tersebut mempunyai ketahanan hidup (*survival*) yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan. Meningkatnya

*survival* disebabkan oleh meningkatnya kemampuan sel-sel imunokompeten dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang dilakukan oleh makrofag teraktivasi sebagai fagosit profesional melalui sitokin yang diproduksi juga melalui aktivasi sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>. Dalam penelitian ini terbukti bahwa prosentase kumulatif angka ketahanan hidup (*survival rate*) pada kelompok mencit yang diinfeksi *L.monocytogenes* dan diberi berbagai dosis ekstrak *A.sativum* lebih besar dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak *A.sativum*. Tetapi semakin tinggi dosis *A.sativum survival ratenya* tidak semakin tinggi. Artinya pemberian *A.sativum* mempengaruhi *survival rate* tapi tidak dipengaruhi kadarnya. Kematian mencit dalam penelitian ini kemungkinan dapat disebabkan oleh menyebarnya toksin *L.monocytogenes* (endotoksemia) sehingga menyebabkan keadaan sepsis dan adanya kegagalan fungsi organ terutama hepar dan otak. Untuk memastikan penyebab kematian ini perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi (PA) pada kedua organ tersebut.

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. KESIMPULAN

1. Pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi (1 mg/hari, 2 mg/hari dan 4 mg/hari) meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag (indeks fagositik) mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* secara bermakna dibandingkan dengan kontrol.
2. Pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi (2 mg/hari dan 4 mg/hari) menurunkan hasil hitung kuman kultur organ hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* secara signifikan sedangkan dengan dosis 1 mg/hari turun tetapi tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol.
3. Pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi (2 mg/hari dan 4 mg/hari) meningkatkan *survival* mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* secara bermakna sedangkan 1 mg/hari meningkat tetapi tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Dari penilaian ketiga variabel di atas maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak *A.sativum* dapat meningkatkan daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes*.

## 6.2. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi konsep pemikiran dalam penelitian ini, antara lain :

- Pemeriksaan sitokin-sitokin dari cairan peritoneal dan organ hepar yang mengaktivasi makrofag khususnya IL-12 dan IFN- $\gamma$ .
- Pemeriksaan aktivitas sel T CD8<sup>+</sup> dan sel PMN netrofil
- Pemeriksaan ROI dan NO yang mungkin berperan dalam mekanisme *killing*
- Pemeriksaan histopatologi (PA) hepar dan otak untuk mengetahui penyebab kematian mencit
- Desain penelitian yang sama diterapkan pada mencit yang imunokompromis.
- Penggunaan jumlah kuman yang bervariasi di bawah LD<sub>50</sub> *L.monocytogenes* untuk menilai ketahanan hidup (*survival*) mencit setelah diberikan ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi pula.
- Desain penelitian untuk kelompok pengamatan *survival* dirubah, misalnya pada hari-hari tertentu ada mencit yang dibunuh untuk diperiksa kemampuan fagositosis makrofagnya serta pertumbuhan kuman pada organ hepar.

## BAB 7

### RINGKASAN

Hasil penelitian ilmiah di berbagai negara maju telah membuktikan bahwa banyak tanaman obat mempunyai aktivitas stimulasi non-spesifik terhadap sistem imun, bersifat sebagai imunomodulator dan bahkan telah ada yang dipakai sebagai bahan fitoterapi. *A.sativum L* yang merupakan salah satu tanaman tradisional juga sudah diketahui manfaatnya dalam mengobati berbagai penyakit yang ringan. Tetapi di Indonesia dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan tanaman obat, masih jarang dilaporkan atau diteliti tentang peran *A.sativum* (bawang putih) sebagai imunomodulator atau imunostimulator dalam mengatasi penyakit infeksi khususnya yang disebabkan oleh bakteri intraseluler.

*L.monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler fakultatif yang banyak dijadikan model untuk mempelajari respons imun seluler karena respons imun protektif utama melawan patogen ini adalah imunitas seluler. Respons imun non-spesifik paling awal melawan kuman ini terutama diperantarai oleh fagosit profesional makrofag tanpa peran sel limfosit. Reaksi selanjutnya tergantung pada kemampuan pejamu untuk meningkatkan respons imun seluler spesifik terutama sel T CD4<sup>+</sup> subset Th1 yang memproduksi IFN- $\gamma$  untuk mengaktivasi makrofag sehingga memperkuat mekanisme bakterisidalnya. Jika respons imun seluler pejamu tidak adekuat, *L.monocytogenes* akan bermultiplikasi dengan bebas di dalam makrofag dan juga di dalam sel hepatosit organ hepar.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya perbedaan daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes* bila diberi ekstrak *A.sativum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut, dengan menilai kemampuan fagositosis makrofag (indeks fagositik), jumlah koloni kuman pada kultur organ hepar (hitung kuman) dan ketahanan hidup (prosentase kumulatif *survival*) karena hal ini belum pernah dilaporkan.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test only control group* menggunakan mencit Balb/C betina sehat, berumur 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM Yogyakarta. Sebanyak 72 ekor mencit diadaptasikan 1 minggu lalu dibagi secara acak menjadi 24 ekor untuk pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah koloni kuman (kelompok I) dan 48 ekor untuk pengamatan ketahanan hidup (kelompok II). Mereka diberi pakan dan minum *ad libitum* selama penelitian. Kelompok I dibagi lagi secara acak menjadi 4 kelompok ; K=kelompok kontrol tanpa perlakuan ; P1=diberi ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari peroral selama 14 hari ; P2=diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari peroral selama 14 hari ; P3=diberi ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari peroral selama 14 hari. Semuanya diinfeksi dengan *L.monocytogenes*  $2,5 \times 10^6$  secara intravena pada hari ke-9 dan dibunuh pada hari ke-14 untuk diperiksa. Untuk pengamatan *survival*, kelompok II dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dan diberi perlakuan ekstrak *A.sativum* yang sama dengan kelompok I. Selanjutnya pada hari ke-15 diinfeksi dengan *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  secara intravena lalu dilakukan pengamatan mulai hari pertama sampai hari ke-21 pasca

infeksi. Kemampuan fagositosis makrofag dihitung dari prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang dihitung pada 200 sel kali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai indeks fagositik. Pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar dinilai dengan cara menghitung jumlah koloni kuman berdasarkan rumus :  $\text{jumlah CFU} \times \text{pengenceran} \times 10 / \text{berat jaringan hepar}$ . Sedangkan ketahanan hidup (*survival*) mencit dinilai berdasarkan lamanya mencit bertahan hidup sejak awal pengamatan (hari pertama pasca infeksi) sampai akhir periode penelitian (hari ke-21 pasca infeksi) dan dinyatakan dalam prosentase *survival*.

Data indeks fagositik makrofag dan hitung kuman kultur organ hepar dianalisis dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U*, sedangkan *survival* dianalisis dengan grafik *survival rate* dan uji beda *logrank test*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi, yaitu 1 mg/hari (kelompok P1), 2 mg/hari (kelompok P2) dan 4 mg/hari (kelompok P3) dapat meningkatkan indeks fagositik makrofag secara bermakna ( $p=0,002$ ) dimana kemampuan fagositosis tertinggi terdapat pada kelompok P3. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *A.sativum* pada dosis tersebut di atas mampu menstimulasi aktivitas makrofag untuk mensekresi (IL-12) dan memacu sel T  $CD4^+$  subset Th1 yang mensekresikan IFN- $\gamma$  sehingga memperkuat mekanisme bakterisidal makrofag, ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag. Hitung kuman kultur organ hepar pada semua kelompok perlakuan juga lebih sedikit dibanding kontrol yang tidak diberikan



ekstrak *A.sativum*. Menurunnya hitung kuman secara bermakna terlihat pada kelompok P2 ( $p=0,004$ ) dan P3 ( $p=0,002$ ) dimana hitung kuman paling sedikit terdapat pada kelompok P3, sedangkan P1 menurun tetapi tidak bermakna. Diduga bahwa pemberian ekstrak *A.sativum* 1 mg/hari dalam penelitian ini belum mampu memacu sel-sel imun selain makrofag yang juga ikut berperan dalam membunuh bakteri di dalam hepar. Hal yang sama juga terlihat pada ketahanan hidup dimana *survival* pada semua kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol tetapi peningkatan secara bermakna terjadi pada kelompok P2 ( $p=0,0125$ ) dan P3 ( $p=0,0208$ ).

Berdasarkan hasil penelitian pada ketiga variabel tersebut di atas maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *A.sativum* dosis bervariasi dapat meningkatkan daya tahan mencit Balb/C yang diinfeksi *L.monocytogenes*. Dengan demikian hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi akan peranan ekstrak *A.sativum* sebagai tanaman tradisional yang dapat meningkatkan imunitas tubuh khususnya dalam melawan patogen intraseluler dan menjadi landasan bagi penelitian selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ma'at S. *Phyllanthus niruri L sebagai imunostimulator pada mencit*. Disertasi Doktorat. Surabaya : Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, 1996 : 1-8.
2. Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Manipulation of the immune response.in immunobiology the immune system in health and disease, fifth edition*. Churchill Livingstone : Garland Publishing, 2001 : 553-96.
3. Elgert KD. *Immunomodulation*. in *Immunology understanding the immune system*. New York : Wiley – Liss a John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1996 : 370-88.
4. Fulder S, Blackwood J, Soetrisno E. *Garlic Nature's Original Remedy*. Penerjemah Slamet. Jakarta : Penerbit Inovasi, 1995 : 6-74.
5. Kesugen M. *Health and Alliums*. Institute for Pharmaceutical Biology University of Bonn. [www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995101/085199101ch15.pdf](http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995101/085199101ch15.pdf)
6. Anonymous. *Bulbus Allii Sativi*, [www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/pdf/016to032.pdf](http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/pdf/016to032.pdf)
7. Kemper KJ. *Garlic (Allium sativum) dalam The Longwood Herbal Task Force page I*. [www.mcp.edu/herbal/default.htm](http://www.mcp.edu/herbal/default.htm).2000.
8. Anonymous. *A comparative look at the superiority of aged garlic extract over other forms of garlic*. in *KYOLIC information*, volume 4. [www.yolic.com/html/kinfo/vol4-3.htm](http://www.yolic.com/html/kinfo/vol4-3.htm).
9. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Immunity to microbes*. in *Cellular and Molecular Immunology* third ed. Philadelphia : WB. Saunders Co.,1997 : 342-60.
10. Badovinac VP, Harty JT. *Adaptive Immunity and Enhanced CD8<sup>+</sup> T Cell Response to Listeria monocytogenes in the Absence of Perforin and IFN- $\gamma$* . J. Immunology. 2000 ; 164 : 6444-52.
11. Cossart P, Lecuit M. *Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement : bacterial vactors, cellular ligands and signaling*. The EMBO Journal. 1998 ; 17 (14) : 3797-806.

12. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants*. Clin Microb Rev. 2001 ; 14 (3) : 584-640.
13. Doyle ME. *Virulence Characteristics of Listeria monocytogenes*. University of Wisconsin-Madison : Food Research Institute, 2001.
14. Bregenholt S, Berche P, Brombacher F, Disanto JP. *Conventional  $\alpha\beta$  T Cells are Sufficient for innate and adaptive immunity against enteric Listeria monocytogenes*. Journal of Immunology. 2001 ; 166 : 1871-76.
15. Conlan JW, North RJ. *Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria Listeria monocytogenes, Francisella tularensis and Salmonella typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leucocytes*. J.Infect & Immun. 1992 : 5164-71.
16. Rogers HW, Unanue ER. *Neutrophils are involved in acute, non spesific resistance to L. monocytogenes in mice*. J. Infect & Immun. 1993 ; 61 (12) : 5090-96.
17. Siegman-Igra Y. et al. *Listeria monocytogenes Infection in Israel and Review of Cases Worldwide*. Emerg. Infect Dis. 2002 ; 8 (3).
18. Anonymous. *Opinion of The Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Listeria monocytogenes*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate General. Europa.eu.int/comm/food/fs/Sc/SCV/out 25-en.pdf.1999.
19. Coggon D, Rose G, Barker DJP. *Epidemiology for the Uninitiated*. Edisi 3 terjemahan. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1996 : 54-58.
20. Subowo. *Imunitas dan infeksi*. dalam *Imunologi Klinik*. Bandung : Penerbit Angkasa, 1993 : 123-53.
21. Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Basic concept in immunology*. in *Imunobiology the immune system in health and desease, fifth edition*. Churchill Livingstone : Garland Publishing, 2001 : 1-34.
22. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *General properties of immune responses*. in *Cellular and Molecular Immunology third edition*. Philadelphia : WB Saunders Co., 1977 : 4-13.

23. Baratawidjaya KG. *Imunologi Dasar*, edisi keempat. Jakarta : Balai Penerbit FK. Universitas Indonesia, 2000 : 1-81.
24. Marsetyawan HNES. *Konsep dasar sistem imun dan respons imun. dalam Kumpulan kuliah biologi sel dan biologi molekuler*. Yogyakarta : Tim Pengelola Program Doktor FK.UGM,2000.
25. Bellanti JA. *Mekanisme imunitas terhadap penyakit bakteri. dalam Imunologi III*. Penerjemah Wahab AS. Yogyakarta : Gajahmada University Press, 1993 : 293-354.
26. Kresno SB. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, edisi keempat. Jakarta : Balai Penerbit FK.UI, 2001 : 1-131.
27. Elgert KD. *Introduction to the immune system in Immunology Understanding The Immune System*. New York : Wiley-Liss a John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1996 : 1-21.
28. Marsetyawan HNES. *Presentasi dan rekognisi antigen. dalam Kumpulan kulaiah biologi sel dan biologi molekuler*. Yogyakarta : Tim Pengelola Program Doktor FK.UGM, 2000.
29. Parslow TG. *The Immune response*. in Stites DP, Ter AI, Parslow TG. *Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> ed. USA : Appleton & Lange, 1997 : 65-73.
30. Vander A, Sherman J, Luciano D. *Human Physiology The mechanism of body function*, 8<sup>th</sup> ed. St.Luois : McGraw-Hill, 2001 : 687-732.
31. Krause KH. *Profesional phagocytes : predators and prey of microorganism*. Sweiz Med Wochenschr. 2000;130 : 97-100.
32. Liwei Lu. *Introduction to Health and Disease Block. Non-Specific Defense Mechanism*. Academic and Administration Block Faculty of Medicine Building. 2002.
33. Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *T cell-mediated immunity. in Immunobiology the immune system in health and disease*, fifth edition. Churchil Livingstone : Garland Publishing, 2001 : 295-340.
34. Muder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. *Murine macrophages secrete interferon- $\gamma$  upon combined stimulation with IL-12 dan IL-18 : a novel pathway of autocrine macrophage activation*. J. Exp.Med. 1998 ; 187 (12) : 2103-8.

35. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Mononuclear phagocytes in immune defence*. In *Immunology*, 6<sup>th</sup> ed. London : Mosby Co., 2001 : 147-62.
36. Unnerstand H. *Listeria monocytogenes-Strain Diversity Demonstrated by Genotyping*. Doctoral Thesis. Swedish : Dept.of Food Hygiene Uppsala Univ.of Agricultural Sciences Uppsala, 2001.
37. Chamberlain NR., *Listeria Laden Luncheon Meat*. University of Texas-Houston : DPALM MEDIC. [www.suite101.com/article.cfm/microbiology/1204](http://www.suite101.com/article.cfm/microbiology/1204). 1995.
38. Jawetz E et al. *Medical Microbiology*. 20<sup>th</sup> ed. Nugroho E, Maulany RF. (alih bahasa). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1996 : 204-10.
39. Que-King W, Fang TJ. *Validation of Growth Models for Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica in Cooked Chicken Meat*. J. Food & Drug Analysis. 2001 ; 9 (3) : 153-59.
40. Drevets DA, Sawyer RT, Potter TA, Campbell PA. *Listeria monocytogenes Infects Human Endothelial Cells by Two Distinct Mechanisms*. Infect. Immun. 1995 ; 63 (11) : 4268-76.
41. Conlan JW, North RJ. *Roles of Listeria monocytogenes Virulence Factors in Survival: Virulence factors distinct from LLO are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism*. Infect.Immun. 1992 ; 60 (3) : 951-7.
42. Sibelius U et al. *Role of Listeria monocytogenes Exotoxins Listeriolysin and Phosphatidilinositol-Specific Phospholipase C in Activation of Human Neutrophils*. Infect. Immun. 1999 ; 67 (3) : 1125-30.
43. Greiffenberg L et al. *Interaction of L. monocytogenes with Human Brain Microvascular Endothelial Cells : Int B-Dependent Invasion, Long-term Intracellular Growth and Spread from Macrophages to Endothelial Cells*. Infect. Immun. 1998 ; 66 (11) : 5260-7.
44. LaCourse R, Ryan L, North RJ. *Expression of NADPH Oxidase-Dependent Resistance to Listeriosis in Mice Occurs during the first 6 to 12 Hours of Liver Infection*. Infect. Immun. 2002 ; 70 (12) : 7179-81.
45. Conlan JW, Nort RJ. *Neutrophils are essential for early anti-listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody*. J of. Exp.Med. 1994 ; 179 : 259-68.

46. Ohya S, Tanabe Y, Makino M, Nomura T, Xiong H, Arakawa M, Mitsuyama M. *The Contributions of Reactive Oxygen Intermediates and Reactive Nitrogen Intermediates to Listericidal Mechanisms Differ in Macrophages Activated Pre- and Postinfection.* Infect. Immun. 1998 ; 66 (9) : 4043-49.
47. Roitt IM, Delves PJ. *Adversarial strategies during infection.* in *Roitt's Essential Immunology*, tenth edition. London : Blackwell Science Ltd., 2001 : 249-280.
48. Appelberg R, Leal Is. *Mutants of L.monocytogenes defective in in vitro invasion and cell to cell spreading still invade and proliferate in hepatocytes of neutropenic mice.* Infect & Immun, 2000 ; 68(2) : 912-4.
49. Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. *Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils.* J.of Immunology, 1996 ; 157(6) : 2514-20.
50. Pfister H, Remer KA, Brcic M, Fatzer R, Christen S, Leib S, Jungi TW. *Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Listeric Encephalitis : A Cross-species Study in Ruminants.* Vet.Pathol. 2002 ; 39 : 139-99.
51. Ouadhrhiri Y, Scorneaux B, Sibille Y, Tulkens PM. *Mechanism of the Intracellular Killing and Modulation of Antibiotic Susceptibility of Listeria monocytogenes in THP-1 Macrophages Activated by Gamma Interferon.* Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 1999 ; 43 (5) : 1242-51.
52. Remer KA, Jungi TW, Fatzer R, Tauber MG, Leib SL. *Nitric Oxide is Protective in Listeric Meningoencephalitis of Rats.* Infect. Immun, 2001 ; 69 (6) : 4086-93.
53. Andersson A, Dai WJ, Disanto JP, Brombacher F. *Early IFN- $\gamma$  Production and Innate Immunity During Listeria monocytogenes Infection in the Absence of NK Cells.* J. Immunology. 1998 ; 161 : 5600-6.
54. Nomura T et al. *Essential Role of Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for Gamma Interferon Production Induced by Listeriolysin O in Mouse Spleen Cells.* Infect. Immun. 2002 ; 70 (3) : 1049-55.
55. Dai WJ, Bartens W, Kohler G, Hufnagel M, Kopf M, Brombacher F. *Impaired Macrophage Listericidal & Cytokine Activities are Responsible for The Rapid Death of Listeria monocytogenes-Infected IFN- $\gamma$  Receptor-Deficient Mice.* J. Immunol. 1997 ; 158 (11) : 5297-304.

56. Genovese F, Mancuso G, Cuzzola M, Biondo C, Beninati C, Delfino D, Teti G. *Role of IL-10 in a Neonatal Mouse Listeriosis Model*. J. Immunology. 1999 ; 163 : 2777-82.
57. Nakane A et al. *Endogenous IL-4 but Not IL-10, is Involved in Suppression of Host Resistance againsts L. monocytogenes Infection in Gamma Interferon-Depleted Mice*. Infect. Immun. 1996 ; 64 (4) : 1252-8.
58. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH. *Substantial in vivo Proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes During Secondary Listeria monocytogenes Infection*. Eur. J. Immunology. 2000 ; 30 (4) : 1053-9.
59. Campbell DJ, Shastri N. *Bacterial Surface Protein Recognized by CD4<sup>+</sup> T Cells During Mice Infection with Listeria monocytogenes*. J. Immunology. 1998 ; 161 : 2339-47.
60. Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, Shen H. *Role of CD4<sup>+</sup> T Cell Help and Costimulation in CD8<sup>+</sup> T Cell Responses During Listeria monocytogenes Infection*. J. Immunology. 2003 ; 170 : 2053-63.
61. Anonymous. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta : Ditjen POM-Depkes RI, 2000 : 83-89.
62. Sudarsono et al. *Tumbuhan Obat*. Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan. Yogyakarta : PPOT-UGM, 1996 : 10-19.
63. Anonymous. *Allium sativum*. In : Scientific Reference for Health Care Professionals. [www.Au med.com](http://www.Au med.com). 2002 : 8.
64. Pizzorno, Murray. *Allium sativum*. [www.healthty.net/library/books/textbook/sec.5/Allium S. 1995 : Allium S.1-6](http://www.healthty.net/library/books/textbook/sec.5/Allium S. 1995 : Allium S.1-6).
65. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga Sh, Itakura Y. *Intake of Garlic and Its Bioactive Components*. J.Nutr. 2001 ; 131:955S-962S.
66. Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. *The Mode of action of allicin : Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity*. Biochemica et Biophysica Acta. 2000 ; 1463 : 20-30.
67. Anonymous. *Dietary Supplements, Herbs, Nutraceuticals : Interaction of Drugs Dietary Agents & Herbs*. Northwestern Memorial Hospital. <http://www.nutraceuticalalliance.com/h11.htm>.2002.

68. Cowan MM. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clin.Microb.Rev. 1999 ; 12 : 564-82.
69. Dharmananda S. *Garlic as The Central Herb Therapy for AIDS*. Portland Oregon. Institute for Traditional Medicine, [www.rdi.9po.or.th/Netzine/V3N42/PCP.htm](http://www.rdi.9po.or.th/Netzine/V3N42/PCP.htm). 1996.
70. Ross ZM, O'gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. *Antimicrobial Properties of Garlic Oil Againsts Human Enteric Bacteria : Evaluation of Methodologies and Comparisons with Garlic Oil Sulfides and Garlic Powder*. Appl.and Environ.Microb. 2001 ; 67 : 475-80.
71. Cauffield JS. *Herbals and other Dietary Supplements in the United States, Part II : Popular Herbal Remedies*. Florida : Midwestern University College of Pharmacy. [www.Innetce.com/articles/pdf/146-000-01-009-H01.pdf](http://www.Innetce.com/articles/pdf/146-000-01-009-H01.pdf). 2001.
72. Anonimous. *The Antibiotic Activity of Garlic*. Nutraceutical Alliance. [www.nutraceuticalalliance.com/research-garlic.htm](http://www.nutraceuticalalliance.com/research-garlic.htm). 2003.
73. Yin M-ch, Tsao Sh-m. *Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species*. Int.J.Food Microb. 1999 ; 49 : 49-56.
74. Joiner-Bey H. *Allium sativum (Garlic)*. In : *Monograph Compiled*. [www.verifiedquality.com/productinfo/html.format/mono-garlic-6000-ug140.htm](http://www.verifiedquality.com/productinfo/html.format/mono-garlic-6000-ug140.htm).
75. Williamson JS, Wyandt CM. *Herbal Therapies : The Facts and The Fiction*. Mississippi ; Departement of Medicinal Chemistry and Departements of Pharmaceutics, National Center for The Development of Natural Products, Research Institute of Pharmaceutical Science. 1999.
76. Wahyuono S. *Bawang Putih (Allium sativum L.) sebagai Penurun Kolesterol Darah*. Buletin PioGAMA. 1999 ; 1.
77. Milner JA. *A Historical Perspective on Garlic and Cancer*. J. Nutr. 2001 ; 131 : 1027S-1031S.
78. Hu X, Cao BN, Hu G, Yang DQ, Wan Ys. *Attenuation of Cell Migration and Induction of Cell Death by Aged Garlic Extract in Rat Sarcoma Cells*. Int. J. Molec. Med. 2002 ; 9 : 641-3.
79. Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. *Pharmacologic Activities of Aged Garlic Extract in Comparison with Other Garlic Preparation*. J. Nutr. 2001 ; 131 : 1080S-1084S.



80. Hodge G, Hodge S, Ping Han. *Allium sativum (Garlic) Suppresses Leukocyte Inflammatori Cytokine Production In Vitro : Potential Therapeutic Use in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. Cytometry. 2002 ; 48 : 209-15.
81. Hobauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD, Frost EA. *Garlic extract reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers*. Middle East J. Anesthesiol. 2000 ; 15 (6) : 649-58.
82. Kyo E, Uda N, Kasuga Sh, Itakura Y. *Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract*. J.Nutr. 2001 ; 131 : 1075S-1079S.
83. Lamnn DL, Riggs DR. *Enhanced Immunocompetence by Garlic : Role in Bladder Cancer and Other Malignancies*. J. Nutr. 2001 ; 131 : 1067S-1070S.
84. Setiawan B. *Rancangan Percobaan*. Dalam : Tjokronegoro A, Sudarsono S. *Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran*, cetakan ketiga. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 1999 : 39-57.
85. Sastroasmoro S. *Pemilihan Subyek Penelitian*. Dalam : Sastroasmoro S, Ismael S (eds). *Metodologi Penelitian Klinis*. Jakarta : Binarupa Aksara, 1995 : 42-51.
86. Ziegler K, Unanue ER. *The specific binding of Listeria monocytogenes immune T lymphocytes to macrophage*. J. Exp. Med. 1979 ; 150 : 1143-60.
87. O'riordan M, Yi CH, Gonzales R, Lee KD, Patnoy DA. *Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway*. J. Proceedings of the National Academic of Science. 2002 ; 99 (21) : 13861-66.
88. Sugiarto, Siagian D, Sunaryanto LT, Oetomo DS. *Teknik Sampling*. Jakarta : PT.Gramedia Pustaka Utama, 2001 : 46-61.
89. Hanafiah KA. *Rancangan Percobaan. Teori & aplikasi*. Jakarta : Penerbit CV.Rajawali, 1991 : 1-8.
90. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Stober W. *Current Protocols in Immunology*, Volume 2. New York : John Wiley & Sons. Inc. : 1991 : 14.6.2-14.6.3.
91. Baron EJ, Peterson LR, Finegol SM. *Diagnostic Microbiology*, 9<sup>th</sup> ed. St.Louis : Mosby-Year book Inc., 1990 : 284-95.
92. Garb JL. *Understanding medical research : a practitiones's guide*, cetakan I edisi Bahasa Indonesia. Jakarta : Penerbit Hipokrates. 2002 : 69-82.

93. Supargiyono. *Mononuclear Phagocyte System (MPs)*. Dalam : Kumpulan Kuliah Difisiensi Biologi Molekuler dan Imunologi. Yogyakarta : Tim Pengelola Program Doktor FK. UGM, 2000.
94. Johan A, Susilaningsih N, Gunadi. *Penelitian in vitro Efek Polifenol dari Teh Hijau terhadap Mekanisme Pertahanan Tubuh pada Mencit yang Diinokulasi Listeria monocytogenes*. Laporan Akhir Penelitian DCRG. Semarang : Domestic Collaborative Research Grant Proyek Penelitian untuk Pengembangan Pascasarjana/URGE Ditjen Dikti Depdiknas, 2000/2001 : 20.
95. Santoso S. *SPSS Versi 10. Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo, 2001 : 261-84,422-30.
96. Dawson B, Trapp RG. *Basic & Clinical Biostatistics*. third edition. Boston : McGraw-HillHigher Education. 2001 : 211-32.